

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner  
 US Department of Commerce  
 United States Patent and Trademark  
 Office, PCT  
 2011 South Clark Place Room  
 CP2/5C24  
 Arlington, VA 22202  
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE  
 in its capacity as elected Office

<b>Date of mailing (day/month/year)</b> 18 May 2001 (18.05.01)	
<b>International application No.</b> PCT/JP00/06471	<b>Applicant's or agent's file reference</b> 1236
<b>International filing date (day/month/year)</b> 21 September 2000 (21.09.00)	<b>Priority date (day/month/year)</b> 21 September 1999 (21.09.99)
<b>Applicant</b> IKEDA, Masato et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒

in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

29 March 2001 (29.03.01)

☐

in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was☐

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO  
 34, chemin des Colombettes  
 1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

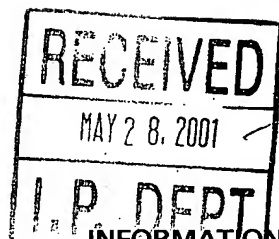
Authorized officer

Antonia Muller

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## PATENT COOPERATION TREATY



PCT

LJD  
JL:10INFORMATION CONCERNING ELECTED  
OFFICES NOTIFIED OF THEIR ELECTION

(PCT Rule 61.3)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.  
6-1, Ohtemachi 1-Chome  
Chiyoda-ku  
Tokyo 100-8185  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 18 May 2001 (18.05.01)		
Applicant's or agent's file reference 1236		IMPORTANT INFORMATION
International application No. PCT/JP00/06471	International filing date (day/month/year) 21 September 2000 (21.09.00)	Priority date (day/month/year) 21 September 1999 (21.09.99)
Applicant KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD. et al		

1. The applicant is hereby informed that the International Bureau has, according to Article 31(7), notified each of the following Offices of its election:

EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE

National : AU, BG, CA, CN, CZ, DE, IL, JP, KR, MN, NO, NZ, PL, RO, RU, SE, SK, US

2. The following Offices have waived the requirement for the notification of their election; the notification will be sent to them by the International Bureau only upon their request:

AP : GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW

EA : AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM

OA : BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG

National : AE, AG, AL, AM, AT, AZ, BA, BB, BR, BY, BZ, CH, CR, CU, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB,  
GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IN, IS, KE, KG, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MW,  
MX, MZ, PT, SD, SG, SI, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW

3. The applicant is reminded that he must enter the "national phase" before the expiration of 30 months from the priority date before each of the Offices listed above. This must be done by paying the national fee(s) and furnishing, if prescribed, a translation of the international application (Article 39(1)(a)), as well as, where applicable, by furnishing a translation of any annexes of the international preliminary examination report (Article 36(3)(b) and Rule 74.1).

Some offices have fixed time limits expiring later than the above-mentioned time limit. For detailed information about the applicable time limits and the acts to be performed upon entry into the national phase before a particular Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The entry into the European regional phase is postponed until 31 months from the priority date for all States designated for the purposes of obtaining a European patent.

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

Antonia Muller

Telephone No. (41-22) 338.83.38

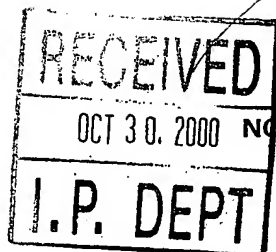
**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## PATENT COOPERATION TREATY

(WPA)

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION OF RECEIPT OF  
RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))

To:

KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.  
6-1, Ohtemachi 1-Chome  
Chiyoda-ku  
Tokyo 100-8185  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 19 October 2000 (19.10.00)	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>
Applicant's or agent's file reference 1236	International application No. PCT/JP00/06471

The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD. (for all designated States except US)  
IKEDA, Masato et al (for US)

International filing date : 21 September 2000 (21.09.00)

Priority date(s) claimed : 21 September 1999 (21.09.99)

Date of receipt of the record copy  
by the International Bureau : 06 October 2000 (06.10.00)

List of designated Offices :

AP : GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW

EA : AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM

EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE

OA : BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG

National : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

**ATTENTION**

The applicant should carefully check the data appearing in this Notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau.

In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex, relating to:

- ☒ time limits for entry into the national phase
- ☒ confirmation of precautionary designations
- ☒ requirements regarding priority documents

A copy of this Notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

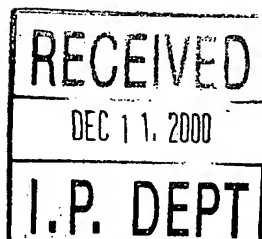
Authorized officer:

Shinji IGARASHI

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Telephone No. (41-22) 338.83.38

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## PATENT COOPERATION TREATY

WPBJD

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.  
6-1, Ohtemachi 1-Chome  
Chiyoda-ku  
Tokyo 100-8185  
JAPON

NOTIFICATION CONCERNING  
SUBMISSION OR TRANSMITTAL  
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

Date of mailing (day/month/year) 20 November 2000 (20.11.00)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 1236	
International application No. PCT/JP00/06471	International filing date (day/month/year) 21 September 2000 (21.09.00)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 21 September 1999 (21.09.99)
Applicant KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD. et al	

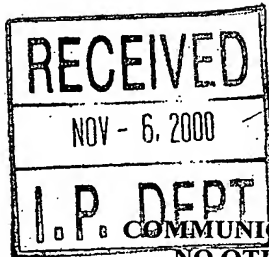
1. The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
3. An asterisk(\*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, **the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c)** which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
4. The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, **the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c)** which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
21 Sept 1999 (21.09.99)	11/266548	JP	15 Nove 2000 (15.11.00)

<p>The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No. (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer</p> <p>Carlos Naranjo</p> <p>Telephone No. (41-22) 338.83.38</p>
---	--

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**





## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

LJP  
JL:10

From the INTERNATIONAL BUREAU

COMMUNICATION IN CASES FOR WHICH  
NO OTHER FORM IS APPLICABLE

To:

KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.  
6-1, Ohtemachi 1-Chome  
Chiyoda-ku  
Tokyo 100-8185  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 20 October 2000 (20.10.00)	
Applicant's or agent's file reference 1236	REPLY DUE see paragraph 1 below
International application No. PCT/JP00/06471	International filing date (day/month/year) 21 September 2000 (21.09.00)
Applicant KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.	

1. ☐ REPLY DUE within \_\_\_\_\_ months/days from the above date of mailing  
☐ NO REPLY DUE, however, see below  
☒ IMPORTANT COMMUNICATION  
☐ INFORMATION ONLY

## 2. COMMUNICATION:

The International Bureau acknowledges receipt on 06 October 2000 (06.10.00) of Form PCT/RO/134 filed together with the international application.

The international Bureau will publish this Form in the pamphlet with the following entry on the cover sheet of the pamphlet:

“With an indication in relation to deposited biological material furnished under PCT Rule 13bis separately from the description“.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer Shinji IGARASHI Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	--

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

10/088594

JC10 Rec'd PCT/PTO 21 MAR 2002

VERIFICATION OF TRANSLATION

I, Kazuyo Saito

of c/o KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD. located at 6-1, Ohtemachi  
1-chome, Chiyoda-ku, Tokyo, Japan

declare as follows:

1. That I am well acquainted with both the English and Japanese  
languages, and

2. That the attached document is a true and correct translation  
made by me to the best of my knowledge and belief of PCT Application  
No. PCT/JP00/06471.

March 5, 2002  
(Date)

  
(Signature of Translator)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## 国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
〔PCT18条、PCT規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 1 2 3 6	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/06471	国際出願日 (日.月.年) 21.09.00	優先日 (日.月.年) 21.09.99
出願人(氏名又は名称) 協和醗酵工業株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

- a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。  
☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。
- b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。  
☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。  
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。  
☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。  
☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、  
第 \_\_\_\_\_ 図とする。☐ 出願人が示したとおりである。 ☒ なし  
☐ 出願人は図を示さなかった。  
☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N 9/10, C12N 15/54, C12N 1/21, C12P 19/18

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N 9/10, C12N 15/54, C12N 1/21, C12P 19/18

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	KOHLER, U. et al. "Transaldolase genes from the cyanobacteria Anabaena variabilis and Synechocystis sp. PCC 6803: comparison with other eubacterial and eukaryotic homologues", Plant Mol. Biol. (1996) Vol. 30, No. 1, p. 213-218, Acc. No. P55193	2-4, 6-16
X	COLE, S. T. et al. "Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence", Nature (1998) Vol. 393, No. 6685, p. 537-544, Acc. No. C70917	2-4, 6-16

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

19. 10. 00

国際調査報告の発送日

31.10.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二



4B

9281

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06471

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N 9/10, C12N 15/54, C12N 1/21, C12P 19/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N 9/10, C12N 15/54, C12N 1/21, C12P 19/18

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KOHLER, U. et al., "Transaldolase genes from the cyanobacteria Anabaena variabilis and Synechocystis sp. PCC 6803: comparison with other eubacterial and eukaryotic homologues", Plant Mol. Biol. (1996) Vol.30, No.1, pp.213-218, Acc. No. P55193	2-4,6-16
X	COLE, S. T. et al., "Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence", Nature (1998) Vol.393, No.6685, pp.537-544, Acc. No. C70917	2-4,6-16

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not

considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
19 October, 2000 (19.10.00)

Date of mailing of the international search report  
31 October, 2000 (31.10.00)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# PCT

## REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

For receiving Office use only

International Application No.

International Filing Date

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference  
(if desired) (12 characters maximum) 1236

<b>Box No. I TITLE OF INVENTION</b>	
NOVEL TRANSALDOLASE GENE	
<b>Box No. II APPLICANT</b>	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)  KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD. 6-1, Ohtemachi 1-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8185 Japan	
<input type="checkbox"/> This person is also inventor.	
Telephone No. 03-3282-0036	
Facsimile No. 03-3282-1527	
Teleprinter No.	
State (that is, country) of nationality: JP	State (that is, country) of residence: JP
This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input checked="" type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box	
<b>Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)</b>	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)  IKEDA Masato c/o Tokyo Research Laboratories KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD. 6-6, Asahi-machi 3-chome, Machida-shi, Tokyo 194-8533 Japan	
This person is: <input type="checkbox"/> applicant only <input checked="" type="checkbox"/> applicant and inventor <input type="checkbox"/> inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)	
State (that is, country) of nationality: JP	State (that is, country) of residence: JP
This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input checked="" type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box	
<input checked="" type="checkbox"/> Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.	
<b>Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE</b>	
The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as: <input type="checkbox"/> agent <input type="checkbox"/> common representative	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)	
Telephone No.	
Facsimile No.	
Teleprinter No.	
<input type="checkbox"/> Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.	



Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)	
<i>If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.</i>	
<p>Name and address: <i>(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)</i></p> <p>TAKANO Yutaka c/o Tokyo Research Laboratories KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD. 6-6, Asahi-machi 3-chome, Machida-shi, Tokyo 194-8533 Japan</p>	<p>This person is:</p> <p><input type="checkbox"/> applicant only</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> applicant and inventor</p> <p><input type="checkbox"/> inventor only <i>(If this check-box is marked, do not fill in below.)</i></p>
State <i>(that is, country)</i> of nationality: JP	State <i>(that is, country)</i> of residence: JP
<p>This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input checked="" type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box</p>	
<p>Name and address: <i>(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)</i></p> <p>NAKANO Tetsuo c/o Ube Plant KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD. 2548, Ohaza-Fujimagari, Ube-shi, Yamaguchi 755-8501 Japan</p>	<p>This person is:</p> <p><input type="checkbox"/> applicant only</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> applicant and inventor</p> <p><input type="checkbox"/> inventor only <i>(If this check-box is marked, do not fill in below.)</i></p>
State <i>(that is, country)</i> of nationality: JP	State <i>(that is, country)</i> of residence: JP
<p>This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input checked="" type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box</p>	
<p>Name and address: <i>(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)</i></p> <p>KAMADA Nozomu c/o Tokyo Research Laboratories KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD. 6-6, Asahi-machi 3-chome, Machida-shi, Tokyo 194-8533 Japan</p>	<p>This person is:</p> <p><input type="checkbox"/> applicant only</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> applicant and inventor</p> <p><input type="checkbox"/> inventor only <i>(If this check-box is marked, do not fill in below.)</i></p>
State <i>(that is, country)</i> of nationality: JP	State <i>(that is, country)</i> of residence: JP
<p>This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input checked="" type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box</p>	
<p>Name and address: <i>(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)</i></p>	<p>This person is:</p> <p><input type="checkbox"/> applicant only</p> <p><input type="checkbox"/> applicant and inventor</p> <p><input type="checkbox"/> inventor only <i>(If this check-box is marked, do not fill in below.)</i></p>
State <i>(that is, country)</i> of nationality:	State <i>(that is, country)</i> of residence:
<p>This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box</p>	
<p><input type="checkbox"/> Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.</p>	

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**Box No.V DESIGNATION OF STATES**

The following designations are hereby made under Rule 4.9(a) (mark the applicable check-boxes; at least one must be marked):

**Regional Patent**

- ☒ **AP ARIPO Patent:** GH Ghana, GM Gambia, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SL Sierra Leone, SZ Swaziland, TZ United Republic of Tanzania, UG Uganda, ZW Zimbabwe, and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT
- ☒ **EA Eurasian Patent:** AM Armenia, AZ Azerbaijan, BY Belarus, KG Kyrgyzstan, KZ Kazakhstan, MD Republic of Moldova, RU Russian Federation, TJ Tajikistan, TM Turkmenistan, and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT
- ☒ **EP European Patent:** AT Austria, BE Belgium, CH and LI Switzerland and Liechtenstein, CY Cyprus, DE Germany, DK Denmark, ES Spain, FI Finland, FR France, GB United Kingdom, GR Greece, IE Ireland, IT Italy, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Netherlands, PT Portugal, SE Sweden, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT
- ☒ **OA OAPI Patent:** BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Central African Republic, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroon, GA Gabon, GN Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauritania, NE Niger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo, and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)

**National Patent (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line):**

- |  |  |
|--|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AE</b> United Arab Emirates                 | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LR</b> Liberia  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AL</b> Albania                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LS</b> Lesotho  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AM</b> Armenia                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LT</b> Lithuania  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AT</b> Austria                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LU</b> Luxembourg   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AU</b> Australia                            | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LV</b> Latvia   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AZ</b> Azerbaijan                           | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MA</b> Morocco  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BA</b> Bosnia and Herzegovina               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MD</b> Republic of Moldova  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BB</b> Barbados                             | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MG</b> Madagascar   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BG</b> Bulgaria                             | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MK</b> The former Yugoslav Republic of Macedonia                      |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BR</b> Brazil                               |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BY</b> Belarus                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MN</b> Mongolia   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CA</b> Canada                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MW</b> Malawi   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CH and LI</b> Switzerland and Liechtenstein | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MX</b> Mexico   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CN</b> China                                | <input checked="" type="checkbox"/> <b>NO</b> Norway   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CR</b> Costa Rica                           | <input checked="" type="checkbox"/> <b>NZ</b> New Zealand  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CU</b> Cuba                                 | <input checked="" type="checkbox"/> <b>PL</b> Poland   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CZ</b> Czech Republic                       | <input checked="" type="checkbox"/> <b>PT</b> Portugal   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>DE</b> Germany                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>RO</b> Romania  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>DK</b> Denmark                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>RU</b> Russian Federation   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>DM</b> Dominica                             | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SD</b> Sudan  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>EE</b> Estonia                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SE</b> Sweden   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>ES</b> Spain                                | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SG</b> Singapore  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>FI</b> Finland                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SI</b> Slovenia   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GB</b> United Kingdom                       | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SK</b> Slovakia   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GD</b> Grenada                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SL</b> Sierra Leone   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GE</b> Georgia                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TJ</b> Tajikistan   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GH</b> Ghana                                | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TM</b> Turkmenistan   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GM</b> Gambia                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TR</b> Turkey   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>HR</b> Croatia                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TT</b> Trinidad and Tobago  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>HU</b> Hungary                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TZ</b> United Republic of Tanzania                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>ID</b> Indonesia                            | <input checked="" type="checkbox"/> <b>UA</b> Ukraine  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>IL</b> Israel                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>UG</b> Uganda   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>IN</b> India                                | <input checked="" type="checkbox"/> <b>US</b> United States of America                                       |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>IS</b> Iceland                              |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>JP</b> Japan                                | <input checked="" type="checkbox"/> <b>UZ</b> Uzbekistan   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KE</b> Kenya                                | <input checked="" type="checkbox"/> <b>VN</b> Viet Nam   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KG</b> Kyrgyzstan                           | <input checked="" type="checkbox"/> <b>YU</b> Yugoslavia   |
| <input type="checkbox"/> <b>KP</b> Democratic People's Republic of Korea           | <input checked="" type="checkbox"/> <b>ZA</b> South Africa   |
|  | <input checked="" type="checkbox"/> <b>ZW</b> Zimbabwe   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KR</b> Republic of Korea                    | Check-boxes reserved for designating States which have become party to the PCT after issuance of this sheet: |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KZ</b> Kazakhstan                           | <input checked="" type="checkbox"/> <b>DZ</b> <input checked="" type="checkbox"/> <b>AG</b>                  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>LC</b> Saint Lucia                          | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MZ</b> <input checked="" type="checkbox"/> <b>BZ</b>                  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>LK</b> Sri Lanka                            |  |

**Precautionary Designation Statement:** In addition to the designations made above, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all other designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) indicated in the Supplemental Box as being excluded from the scope of this statement. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit. (Confirmation (including fees) must reach the receiving Office within the 15-month time limit.)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

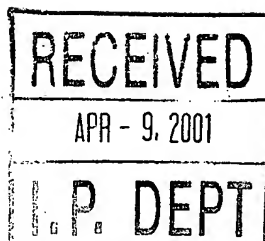


<b>Box No. VI PRIORITY CLAIM</b>		<input type="checkbox"/> Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.		
Filing date of earlier application (day/month/year)	Number of earlier application	Where earlier application is:		
		national application: country	regional application:* regional Office	international application: receiving Office
item (1)  21.09.99	266548/99	JP		
item (2)				
item (3)				
<input checked="" type="checkbox"/> The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) (only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of the present international application is the receiving Office) identified above as item(s): (1)				
<small>* Where the earlier application is an ARIPO application, it is mandatory to indicate in the Supplemental Box at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii)). See Supplemental Box.</small>				
<b>Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY</b>				
<b>Choice of International Searching Authority (ISA)</b> (if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used):		<b>Request to use results of earlier search; reference to that search (if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority):</b>  Date (day/month/year)      Number      Country (or regional Office)		
ISA /				
<b>Box No. VIII CHECK LIST; LANGUAGE OF FILING</b>				
This international application contains the following number of sheets: request : 4 description (excluding sequence listing part) : 26 claims : 2 abstract : 1 drawings : 0 sequence listing part of description : 12 Total number of sheets : 45		This international application is accompanied by the item(s) marked below: 1. <input type="checkbox"/> fee calculation sheet 2. <input type="checkbox"/> separate signed power of attorney 3. <input type="checkbox"/> copy of general power of attorney, reference number, if any: 4. <input type="checkbox"/> statement explaining lack of signature 5. <input type="checkbox"/> priority document(s) identified in Box No. VI as item(s): 6. <input type="checkbox"/> translation of international application into (language): 7. <input type="checkbox"/> separate indications concerning deposited microorganism or other biological material 8. <input type="checkbox"/> nucleotide and/or amino acid sequence listing in computer readable form 9. <input type="checkbox"/> other (specify): <b>Written Statement and Document providing information about FD record format, etc.</b>		
Figure of the drawings which should accompany the abstract:		Language of filing of the international application: the Japanese		
<b>Box No. IX SIGNATURE OF APPLICANT OR AGENT</b>				
Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).				
IKEDA Masato      NAKANO Tetsuo  KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.  TAKANO Yutaka      KAMADA Nozomu				

For receiving Office use only	
1. Date of actual receipt of the purported international application:  3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:  4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):  5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA /	2. Drawings:  <input type="checkbox"/> received:  <input type="checkbox"/> not received:  6. <input type="checkbox"/> Transmittal of search copy delayed until search fee is paid.

For International Bureau use only
Date of receipt of the record copy by the International Bureau:

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



**PATENT COOPERATION TREATY**  
WPC JD  
PCT

PLCN

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:  
KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.  
6-1, Ohtemachi 1-Chome  
Chiyoda-ku  
Tokyo 100-8185  
JAPON

**NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE  
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL  
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES**

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

Date of mailing (day/month/year) 29 March 2001 (29.03.01)		
Applicant's or agent's file reference 1236		<b>IMPORTANT NOTICE</b>
International application No. PCT/JP00/06471	International filing date (day/month/year) 21 September 2000 (21.09.00)	
		Priority date (day/month/year) 21 September 1999 (21.09.99)
Applicant KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD. et al		

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:  
AU, KR, US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

AE, AG, AL, AM, AP, AT, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EA, EE, EP, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OA, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU,  
The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on  
29 March 2001 (29.03.01) under No. WO 01/21774

**REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)**

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

**REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))**

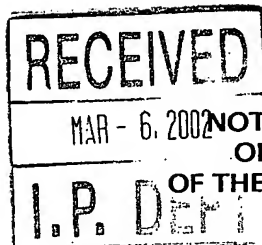
If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer J. Zahra
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

PCT PATENT COOPERATION TREATY



PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL  
OF COPIES OF TRANSLATION  
OF THE INTERNATIONAL PRELIMINARY  
EXAMINATION REPORT

(PCT Rule 72.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.  
6-1, Ohtemachi 1-Chome  
Chiyoda-ku  
Tokyo 100-8185  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 20 February 2002 (20.02.02)	
Applicant's or agent's file reference 1236	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>
International application No. PCT/JP00/06471	International filing date (day/month/year) 21 September 2000 (21.09.00)
Applicant KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD. et al	

**1. Transmittal of the translation to the applicant.**

The International Bureau transmits herewith a copy of the English translation made by the International Bureau of the international preliminary examination report established by the International Preliminary Examining Authority.

**2. Transmittal of the copy of the translation to the elected Offices.**

The International Bureau notifies the applicant that copies of that translation have been transmitted to the following elected Offices requiring such translation:

EP, AT, CA, CH, CN, FI, NO, NZ, RO, RU, SK, US

The following elected Offices, having waived the requirement for such a transmittal at this time, will receive copies of that translation from the International Bureau only upon their request:

AP, EA, AE, AG, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, PL, PT, SD, SE, SG, SI, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW, OA

**3. Reminder regarding translation into (one of) the official language(s) of the elected Office(s).**

The applicant is reminded that, where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report.

It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned (Rule 74.1). See Volume II of the PCT Applicant's Guide for further details.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland  Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer  Eliott PERETTI  Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

87  
Translation

PATENT COOPERATION TREA.

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 1236	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/06471	International filing date (day/month/year) 21 September 2000 (21.09.00)	Priority date (day/month/year) 21 September 1999 (21.09.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 9/10, 15/54, 1/21, C12P 19/18		
Applicant KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 3 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of \_\_\_\_\_ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 29 March 2001 (29.03.01)	Date of completion of this report 24 July 2001 (24.07.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/06471

## I. Basis of the report

## 1. With regard to the elements of the international application:\*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the claims:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

## 2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

## 3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement****1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1,5,7-16	YES
	Claims	2-4,6	NO
Inventive step (IS)	Claims	1,5	YES
	Claims	2-4,6-16	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-16	YES
	Claims		NO

**2. Citations and explanations**

Document 1: Kohler, U. et al., Plant Mol. Biol. Vol. 30, No. 1, 1996, pp. 213-218

Document 2: Cole, S. T. et al., Nature, Vol. 393, No. 6685, 1998, pp. 537-544

Based on the descriptions in documents 1 and 2 cited in the international search report, the inventions set forth in Claims 2-4 and 6 do not appear to be novel and do not appear to involve an inventive step. Documents 1 and 2 describe a polypeptide having transaldolase activity and comprising an amino acid sequence in which 1 or more amino acids have been deleted from, substituted in, or added to the amino acid sequence identified as Sequence ID No. 1, and the DNA that codes for that polypeptide, as well as a polypeptide having transaldolase activity that contains an amino acid sequence having 60% or greater homology with the amino acid sequence identified as Sequence ID No. 1, and the DNA that codes for that polypeptide.

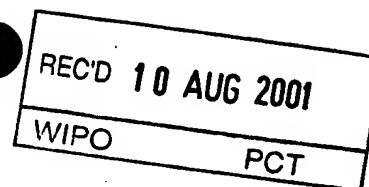
Based on the descriptions in documents 1 and 2, the inventions set forth in Claims 7-16 do not appear to involve an inventive step. Persons skilled in the art can easily culture a transformant in which the DNA that codes for the polypeptide described in documents 1 and 2 is introduced into a suitable host, and cause that polypeptide, an aromatic amino acid, aromatic vitamin, L-histidine, riboflavin, nucleic acid and nucleic acid-substance substance to be produced in the cultured cells.

None of the documents cited in the international search report describes the inventions set forth in Claims 1 and 5, and therefore these inventions appear to be novel and appear to involve an inventive step. Documents 1 and 2 do not describe the polypeptide comprising the amino acid sequence identified as Sequence ID No. 1 and the DNA having the base sequence identified as Sequence ID No. 2, and persons skilled in the art could not easily conceive of these matters.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

P C T

## 国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
〔PCT36条及びPCT規則70〕

出願人又は代理人 の書類記号 1 2 3 6	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。		
国際出願番号 PCT/JPO0/06471	国際出願日 (日.月.年) 21.09.00	優先日 (日.月.年) 21.09.99	
国際特許分類 (IPC) Int. Cl <sup>7</sup> C12N 9/10, C12N 15/54, C12N 1/21, C12P 19/18			
出願人 (氏名又は名称) 協和醗酵工業株式会社			

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。  <input type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。 (PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照) この附属書類は、全部で ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。  I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎 II <input type="checkbox"/> 優先権 III <input type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成 IV <input type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如 V <input checked="" type="checkbox"/> PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明 VI <input type="checkbox"/> ある種の引用文献 VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備 VIII <input type="checkbox"/> 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 29.03.01	国際予備審査報告を作成した日 24.07.01		
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員)  高堀 栄二	4 B	9 2 8 1
電話番号 03-3581-1101 内線 3448			

様式PCT/IPEA/409 (表紙) (1998年7月)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に  
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- |                                     |                |                      |
|-------------------------------------|----------------|----------------------|
| <input type="checkbox"/> 明細書        | 第 _____ ページ、   | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> 明細書        | 第 _____ ページ、   | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書        | 第 _____ ページ、   | 付の書簡と共に提出されたもの       |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 _____ 項、     | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 _____ 項、     | PCT19条の規定に基づき補正されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 _____ 項、     | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 _____ 項、     | 付の書簡と共に提出されたもの       |
| <input type="checkbox"/> 図面         | 第 _____ ページ/図、 | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> 図面         | 第 _____ ページ/図、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面         | 第 _____ ページ/図、 | 付の書簡と共に提出されたもの       |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ ページ、   | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ ページ、   | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ ページ、   | 付の書簡と共に提出されたもの       |

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

## 新規性(N)

請求の範囲	1、5、7-16	有
請求の範囲	2-4、6	無

## 進歩性(I S)

請求の範囲	1、5	有
請求の範囲	2-4、6-16	無

## 産業上の利用可能性(I A)

請求の範囲	1-16	有
請求の範囲		無

## 2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

文献1: KOHLER, U. et al., Plant Mol. Biol. (1996) Vol. 30, No. 1, p. 213-218

文献2: COLE, S. T. et al., Nature (1998) Vol. 393, No. 6685, p. 537-544

請求の範囲2-4、6は、国際調査で引用された文献1又は文献2により新規性及び進歩性を有しない。文献1、2には、配列番号1記載のアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつトランスアルドラーゼ活性を有するポリペプチド、該ポリペプチドをコードするDNA、配列番号1記載のアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつトランスアルドラーゼ活性を有するポリペプチド、該ポリペプチドをコードするDNAが記載されている。

請求の範囲7-16は、文献1又は文献2により進歩性を有しない。文献1、2に記載されている前記ポリペプチドをコードするDNAを適当な宿主に組み込んだ形質転換体を培養し、培養物中に前記ポリペプチド、芳香族アミノ酸、芳香族ビタミン、L-ヒスチジン、リボフラビン、核酸、核酸関連物質を生成させることは、当業者が容易になし得ることである。

請求の範囲1、5に記載された発明は、国際調査報告に記載された上記文献の何れにも開示されておらず、新規性及び進歩性を有する。文献1、2には、配列番号1記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、配列番号2記載の塩基配列を有するDNAは記載されておらず、当業者といえども容易に想到し得ないものである。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2001年3月29日 (29.03.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/21774 A1

(51) 国際特許分類: C12N 9/10, 15/54, 1/21, C12P 19/18

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/06471

(22) 国際出願日: 2000年9月21日 (21.09.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願平11/266548 1999年9月21日 (21.09.1999) JP(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 協和醸酵  
工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.)  
[JP/JP]; 〒100-8185 東京都千代田区大手町一丁目6番  
1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 池田正人 (IKEDA,  
Masato) [JP/JP]. 高野 裕 (TAKANO, Yutaka) [JP/JP].  
鎌田 望 (KAMADA, Nozomu) [JP/JP]; 〒194-8533 東  
京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醸酵工業株式会社  
東京研究所内 Tokyo (JP). 中野哲郎 (NAKANO, Tetsuo)[JP/JP]; 〒755-8501 山口県宇部市大字藤曲2548番地  
協和醸酵工業株式会社 宇部工場内 Yamaguchi (JP).(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,  
DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL,  
IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV,  
MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT,  
RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA,  
UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,  
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許  
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI,  
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

— 明細書とは別に規則 13 の 2 に基づいて提出された  
生物材料の寄託に関する表示。2文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL TRANSALDOLASE GENE

(54) 発明の名称: 新規トランスアルドラーゼ遺伝子

(57) Abstract: Attempts are made to provide a novel transaldolase gene; a polypeptide encoded by this gene; a recombinant DNA obtained by integrating this gene; a microorganism carrying this recombinant DNA; and a process for producing an aromatic amino acid, an aromatic vitamin, L-histidine, riboflavin, a nucleic acid, a nucleic acid-associated substance, a novel saccharide, etc. by using the above microorganism. As the results of extensive studies, a novel transaldolase gene is isolated from chromosomal DNA of a microorganism belonging to the genus *Corynebacterium* as a DNA fragment complementary to the requirement for shikimic acid of a transketolase defective variant obtained as a variant with the requirement for shikimic acid belonging to the genus *Corynebacterium*. Further, a recombinant DNA containing this gene is constructed and transferred into a host microorganism, thereby achieving the objects as described above.

[続葉有]

WO 01/21774 A1



---

(57) 要約:

本発明の目的は、新規なトランスアルドラーゼ遺伝子、および該遺伝子にコードされるポリペプチド、該遺伝子を組み込んで得られる組換え体DNA、該組換え体DNAを保有する微生物、および該微生物を利用した芳香族アミノ酸、芳香族ビタミン、L-ヒスチジン、リボフラビン、核酸、核酸関連物質、新規な糖等の製造法を提供することにある。

本発明者らは、上記目的を達成するために鋭意検討した。その結果、コリネバクテリウム属に属し、シキミ酸要求性変異株として取得されるトランスケトララーゼ欠損変異株のシキミ酸要求性を相補するDNA断片として、コリネバクテリウム属に属する微生物の染色体DNAより新規トランスアルドラーゼ遺伝子を単離した。さらに、該遺伝子を含む組換え体DNAを構築し、該組換え体DNAを宿主微生物に導入することで、該目的を達成することができることを見出し、本発明を完成するに至った。

明 細 書新規トランスアルドラーゼ遺伝子技術分野

本発明は、新規に見出されたトランスアルドラーゼ遺伝子、および該遺伝子にコードされるポリペプチド、該遺伝子を組み込んで得られる組換え体DNA、該組換え体DNAを保有する形質転換体、および該形質転換体を利用した、該ポリペプチド、芳香族アミノ酸、芳香族ビタミン、L-ヒスチジン、リボフラビン、核酸、核酸関連物質、あるいは新規な糖等の製造法に関する。

背景技術

トランスアルドラーゼはペントースリン酸経路の酵素であり、芳香族アミノ酸や芳香族ビタミン等の芳香族化合物、プリンヌクレオチドやピリミジンヌクレオチド等の核酸関連物質、L-ヒスチジン、リボフラビン等の生合成や代謝に重要な役割を担っている[Arch. Microbiol., 164, 324(1995)]。従って、それら代謝産物の効率的な発酵生産菌を育種するための標的として、トランスアルドラーゼ遺伝子およびその遺伝子産物は有用である。

トランスアルドラーゼをコードするDNAについては、エシェリヒア・コリ由来の遺伝子[GeneBank Accession Number D13159]、マイコバクテリウム・ツベルクロシス由来の遺伝子[Nature, 393, 537 (1998)]、シネココッカス由来の遺伝子[Plant Mol. Biol., 30, 213 (1996)]等が単離され、その塩基配列が決定されている。

また、エシェリヒア・コリでは、トランスアルドラーゼ活性を増加させると芳香族化合物等の生産性が向上することが報告されている (W098/18936)。

しかしながら、アミノ酸発酵等で広く用いられている産業上重要なコリネバクテリウム属に属する微生物については、これまでにトランスアルドラーゼ遺伝子や該遺伝子にコードされる酵素に関する報告はなく、従ってその塩基配列についても全く知られていなかった。

トランスアルドラーゼを用いた糖の合成については、澱粉を処理したものからD-フルクトースを生成するために使用された例[J. Am. Chem. Soc., 114, 6980

(1992)]が報告されている。

### 発明の開示

本発明の課題は、新規に見出されたトランスアルドラーゼ遺伝子、および該遺伝子にコードされるポリペプチド、該遺伝子を組み込んで得られる組換え体DNA、該組換え体DNAを保有する形質転換体、および該形質転換体を利用した、該ポリペプチド、芳香族アミノ酸、芳香族ビタミン、L-ヒスチジン、リボフラビン、核酸および核酸関連物質、新規な糖等の製造法を提供することにある。

本発明者らは、上記課題を解決すべく、組換えDNA手法を駆使してコリネバクテリウム属に属する微生物の染色体由来の遺伝子に関して鋭意検討した。その結果、ペントースリン酸経路上でトランスアルドラーゼとは別の酵素であるトランスケトラーゼをコードする遺伝子の3'側下流にトランスアルドラーゼ遺伝子が隣接して存在することを初めて見出し、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は下記(1)～(16)に関する。

(1) 配列番号1記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(2) 配列番号1記載のポリペプチドにおいて、1以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつトランスアルドラーゼ活性を有するポリペプチド。

(3) 配列番号1記載のアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつトランスアルドラーゼ活性を有する蛋白質。

(4) 上記(1)～(3)いずれか1つのポリペプチドをコードするDNA。

(5) 配列番号2記載の塩基配列を有するDNA。

(6) 上記(4)または(5)のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAであり、かつトランスアルドラーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA。

(7) 上記(4)～(6)いずれか一つのDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNA。

(8) 上記(7)の組換え体DNAを保有する形質転換体。

(9) 上記(8)の形質転換体が保有する上記(4)～(6)いずれか1つのDNA、または該DNAの上流に存在する転写・翻訳に関わるDNAの塩基配列中に1以上の塩基が置換、欠失若しくは挿入され、かつ該置換、欠失若しくは挿入前に比べてトランスアルドラーゼの活性が増強された形質転換体。

(10) 形質転換体が、芳香族アミノ酸または芳香族ビタミンを生産する能力を有する形質転換体である、上記(8)または(9)の形質転換体。

(11) 上記(10)の形質転換体を培地に培養し、培養物中に芳香族アミノ酸または芳香族ビタミンを生成蓄積させ、該培養物より該物質を採取することを特徴とする、該物質の製造法。

(12) 上記(8)の形質転換体が保有する上記(4)～(6)いずれか1つのDNA、または該DNAの上流に存在する転写・翻訳に関わるDNAの塩基配列中に1以上の塩基が置換、欠失若しくは挿入され、かつ該置換、欠失若しくは挿入前に比べてトランスアルドラーゼの活性が低下または欠損した形質転換体。

(13) 形質転換体が、L-ヒスチジン、リボフラビン、核酸および核酸関連物質から選ばれる物質を生産する能力を有する形質転換体である、上記(8)または(12)の形質転換体。

(14) 上記(13)の形質転換体を培地に培養し、培養物中にL-ヒスチジン、リボフラビン、核酸および核酸関連物質から選ばれる物質を生成蓄積させ、該培養物より該物質を採取することを特徴とする、該物質の製造法。

(15) 上記(8)の形質転換体を培地に培養し、培養物中に上記(1)～(3)いずれか1つのポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物より該ポリペプチドを採取することを特徴とする、上記(1)～(3)いずれか1つのポリペプチドの製造法。

(16) 上記(8)または(9)の形質転換体、該形質転換体の培養物または該培養物の処理物を酵素源として用い、ケトースおよびアルドースを水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に該アルドースに該ケトースのジヒドロキシアセトン部分の転移された糖を生成蓄積させ、該水性媒体から該糖を採取することを特徴とする、該糖の製造法。

以下、本発明を詳細に説明する。

#### (1) 本発明のポリペプチド

本発明のポリペプチドは、配列番号 1 記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドである。また、配列番号 1 記載のアミノ酸配列において 1 以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつトランスアルドラーゼ活性を有するポリペプチドも本発明のポリペプチドに包含される。

該欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつトランスアルドラーゼ活性を有するポリペプチドは、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) (以下、モレキュラー・クローニング 第 2 版と略す)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997) (以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと略す)、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985) 等に記載の部位特異的変異導入法を用いて、例えば配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする DNA に部位特異的変異を導入することにより、取得することができる。

欠失、置換若しくは付加されるアミノ酸の数は特に限定されないが、1 個から数十個、特に 1 個から数個のアミノ酸であることが好ましい。また、本発明のポリペプチドがトランスアルドラーゼ活性を有するためには、配列番号 1 記載のアミノ酸配列と少なくとも 60% 以上、通常は 80% 以上、特に 95% 以上の相同性を有していることが好ましい。

ただし、本発明のポリペプチドには、公知のトランスアルドラーゼ活性を有するポリペプチドは含まれない。

#### (2) 本発明の DNA

本発明の DNA は、本発明のポリペプチドをコードする DNA である。本発明の DNA としては、例えば、配列番号 2 記載の DNA をあげることができる。



また、配列番号2記載のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAも本発明のDNAに包含される。該ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとは、配列表の配列番号2に示される塩基配列を有するDNAまたは該DNAの内部断片をプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAを意味し、具体的には、コロニーあるいはブランク由来のDNAまたは該DNAの断片を固定化したフィルターを用いて、0.7~1.0mol/lのNaCl存在下、65°Cでハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2倍程度のSSC溶液（1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mmol/l 塩化ナトリウム、15mmol/l クエン酸ナトリウムよりなる）を用い、65°C条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNAをあげることができる。

ハイブリダイゼーションは、モレキュラー・クローニング 第2版等の実験書に記載されている方法に準じて行うことができる。ハイブリダイズ可能なDNAとして具体的には、配列番号2に示される塩基配列と少なくとも80%以上の相同性を有するDNA、好ましくは95%以上の相同性を有するDNAをあげることができる。

ただし、本発明のDNAには公知の、トランスアルドラーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNAは含まれない。

本発明のDNAは、コリネバクテリウム属に属する微生物の染色体DNAから、後述する方法により単離することができる。遺伝子の供与体となるコリネバクテリウム属に属する微生物としてはコリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属する菌株であればいずれも使用できる。そのような微生物の具体例としては、例えば下記の菌株をあげることができる。

コリネバクテリウム・グルタミクム	ATCC 31833
コリネバクテリウム・グルタミクム	ATCC 13032
コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム	ATCC 13870
コリネバクテリウム・カルナエ	ATCC 15991
コリネバクテリウム・ハーキュリス	ATCC 13868

コリネバクテリウム・メラセコーラ	ATCC 17965
コリネバクテリウム・リリウム	ATCC 15990
コリネバクテリウム・アンモニアゲネス	ATCC 6872
ブレビバクテリウム・イマリオフィラム	ATCC 14068
ブレビバクテリウム・サッカロリティカム	ATCC 14066
ブレビバクテリウム・チオゲニタリス	ATCC 19240
ブレビバクテリウム・ディバリカツム	ATCC 14020
ブレビバクテリウム・フラブム	ATCC 14067
ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム	ATCC 13869

コリネバクテリウム属に属する微生物からの染色体DNAの抽出は、培養菌体から、常法【例えば特開昭58-126789に記載の方法】に従って容易に行うことができる。染色体DNAからの本発明のDNAの単離は、シキミ酸要求性変異株として取得されるトランスケトララーゼ欠損変異株[Appl. Microbiol. Biotechnol., 50, 375 (1998)]の相補で選択することにより実施できる。

すなわち、染色体DNAを適当な制限酵素で切断し、ベクタープラスミドに連結後、該プラスミドを用いてトランスケトララーゼ遺伝子欠損株【例えば、コリネバクテリウム・グルタミクムTKT6株(FERM BP-6399)]を形質転換し、シキミ酸要求性が回復した形質転換株を選択する。該形質転換株が有するプラスミドを単離することによって、トランスケトララーゼ遺伝子と共に本発明のDNAを取得することができる。

このようにして、配列番号2で示される本発明のDNAが一旦取得され、その塩基配列が決定された後は、該塩基配列の5'端および3'端の塩基配列に基づいたプライマーを調製し、コリネバクテリウム属に属する微生物から調製した染色体DNAを鋳型として、PCR法[PCR Protocols, Academic Press (1990)]を用いてDNAの増幅を行うことにより、他のコリネバクテリウム属に属する微生物から本発明のDNAを容易に取得することができる。

また、配列番号2で示されるDNAの全長または一部をプローブとして、コリネバクテリウム属に属する微生物から調製した染色体DNAに対してコロニーハイ

ブリダイゼーションやブランクハイブリダイゼーション（モレキュラー・クローニング 第2版）を行うことにより、他のコリネバクテリウム属に属する微生物から本発明のDNAを取得することができる。

さらに、配列番号2で示される塩基配列に基づいて、フォスフォアミダイト法を利用したパーキン・エルマー社のDNA合成装置で化学合成することによっても、本発明のDNAを取得することができる。

### （3）本発明のポリペプチドの製造

本発明のポリペプチドは、モレキュラー・クローニング 第2版やカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された方法等を用い、例えば以下の方法により、本発明のDNAを宿主細胞中で発現させて、製造することができる。

該ポリペプチドをコードする部分を含む適当な長さのDNA断片を調製する。また、必要に応じて、本発明のポリペプチドをコードする部分の塩基配列を、宿主細胞の発現に最適なコドンとなるように塩基を置換したDNAを調製する。該DNAは本発明のポリペプチドの効率的製造に有用である。

該DNA断片を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。

該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入する。

宿主細胞としては、細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれも用いることができる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体中への組込が可能で、本発明のポリペプチドをコードするDNAを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

細菌等の原核生物を宿主細胞として用いる場合は、本発明のポリペプチドをコードするDNAを含有してなる組換えベクターは原核生物中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、本発明のDNA、転写終結配列、より構成されたベクターであることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

発現ベクターとしては、例えば、pBTrp2、pBTac1、pBTac2（いずれもベーリンガーマンハイム社より市販）、pKK233-2（Pharmacia社製）、pSE280（Invitrogen社製）、pGEMEX-1（Promega社製）、pQE-8（QIAGEN社製）、pKYP10（特開昭58-110600）、pKYP200〔Agric. Biol. Chem., 48, 669 (1984)〕、pLSA1〔Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)〕、pGEL1〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985)〕、pBluescript II SK(-)（Stratagene社製）、pTrs30〔Escherichia coli JM109/pTrs30（FERM BP-5407）より調製〕、pTrs32〔Escherichia coli JM109/pTrs32（FERM BP-5408）より調製〕、pGHA2〔Escherichia coli IGHA2（FERM B-400）より調製、特開昭60-221091〕、pGKA2〔Escherichia coli IGKA2（FERM BP-6798）より調製、特開昭60-221091〕、pTerm2（US4686191、US4939094、US5160735）、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pEG400〔J. Bacteriol., 172, 2392 (1990)〕、pGEX（Pharmacia社製）、pETシステム（Novagen社製）等をあげることができる。

プロモーターとしては、宿主細胞中で機能するものであればいかなるものでもよい。例えば、trpプロモーター（ $P_{trp}$ ）、lacプロモーター、 $P_L$ プロモーター、 $P_R$ プロモーター、T7プロモーター等の、大腸菌やファージ等に由来するプロモーターをあげることができる。また $P_{trp}$ を2つ直列させたプロモーター（ $P_{trp} \times 2$ ）、tacプロモーター、lacT7プロモーター、let Iプロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

リボソーム結合配列であるシャイン・ダルガノ（Shine-Dalgarno）配列と開始コドンとの間を適当な距離（例えば6～18塩基）に調節したプラスミドを用いることが好ましい。

本発明の組換えベクターにおいては、本発明のDNAの発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、構造遺伝子の直下に転写終結配列を配置することが好ましい。

宿主細胞としては、エシェリヒア属、セラチア属、バチルス属、ブレヴィバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ミクロバクテリウム属、シュードモナス属等に属する微生物、例えば、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli MC1000、Escherichia coli KY3276、

Escherichia coli W1485、Escherichia coli JM109、Escherichia coli HB101、Escherichia coli No.49、Escherichia coli W3110、Escherichia coli NY49、Escherichia coli GI698、Escherichia coli TB1、Serratia ficaria、Serratia fonticola、Serratia liquefaciens、Serratia marcescens、Bacillus subtilis、Bacillus amyloliquefaciens、Brevibacterium ammoniagenes、Brevibacterium immariophilum ATCC14068、Brevibacterium saccharolyticum ATCC14066、Brevibacterium flavum ATCC14067、Brevibacterium lactofermentum ATCC13869、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Corynebacterium glutamicum ATCC13869、Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870、Microbacterium ammoniaphilum ATCC15354、Pseudomonas putida、Pseudomonas sp. D-0110等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)〕、プロトプラスト法（特開昭63-2483942）、またはGene, 17, 107 (1982)やMolecular & General Genetics, 168, 111 (1979)に記載の方法等をあげることができる。

酵母を宿主細胞として用いる場合には、組換えベクターとして、例えば、YEP13(ATCC37115)、YEp24(ATCC37051)、YCp50(ATCC37419)、pHS19、pHS15等をあげることができる。

プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、ヘキソースキナーゼ等の解糖系の遺伝子のプロモーター、PH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、gal 1プロモーター、gal 10プロモーター、ヒートショックポリペプチドプロモーター、MF  $\alpha$ 1プロモーター、CUP 1プロモーター等をあげることができる。

宿主細胞としては、サッカロマイセス (Saccharomyces) 属、シゾサッカロマイセス (Schizosaccharomyces) 属、クリベロマイセス (Kluyveromyces) 属、トリコスポロン (Trichosporon) 属、シワニオマイセス (Schwanniomyces) 属、ピヒア (Pichia) 属、キャンディダ (Candida) 属等に属する微生物、例えば、Saccharomyces

cerevisiae、Schizosaccharomyces pombe、Kluyveromyces lactis、Trichosporon pullulans、Schwanniomyces alluvius、Candida utilis等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法[Methods Enzymol., 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)]、酢酸リチウム法[J. Bacteriology, 153, 163 (1983)]、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)記載の方法等をあげることができる。

動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、pcDNA1、pcDM8 (フナコシ社製)、pAGE107 [特開平3-22979、Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、pAS3-3 (特開平2-227075)、pCDM8 [Nature, 329, 840 (1987)]、pcDNA1/Amp (Invitrogen社製)、pREP4 (Invitrogen社製)、pAGE103 [J. Biochem., 101, 1307 (1987)]、pAGE210等をあげることができる。

プロモーターとしては、動物細胞中で機能するものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス (CMV) のIE (immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、SR $\alpha$ プロモーター等をあげることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

宿主細胞としては、ヒトの細胞であるナマルバ (Namalwa) 細胞、サルの細胞であるCOS細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞、HBT5637 (特開昭63-299) 等をあげることができる。

動物細胞への組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)]、Virology, 52, 456 (1973)等をあげることができる。

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory

Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)、Bio/Technology, 6, 47 (1988)等に記載された方法によって、ポリペプチドを発現することができる。

即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、ポリペプチドを発現させることができる。

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII (ともにInvitrogen社製) 等をあげることができる。

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフィア・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス(Autographa californica nuclear polyhedrosis virus)等を用いることができる。

昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞であるSf9、Sf21 [Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)]、Trichoplusia niの卵巣細胞であるHigh 5 (Invitrogen社製) 等を用いることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)] 等をあげることができる。

植物細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、Tiプラスミド、タバコモザイクウイルスベクター等をあげることができる。

プロモーターとしては、植物細胞中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の35Sプロモーター、イネアクチン1プロモーター等をあげることができる。

宿主細胞としては、タバコ、ジャガイモ、トマト、ニンジン、ダイズ、アブラナ、アルファルファ、イネ、コムギ、オオムギ等の植物細胞等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、植物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、アグロバクテリウム (Agrobacterium) (特開昭59-140885、特開昭60-70080、W094/00977)、エレクトロポレーション法 (特

開昭60-251887)、パーティクルガン(遺伝子銃)を用いる方法(特許第2606856、特許第2517813)等をあげることができる。

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クローニング第2版に記載されている方法等に準じて、分泌生産、融合タンパク質発現等を行うことができる。

酵母、動物細胞、昆虫細胞または植物細胞により発現させた場合には、糖あるいは糖鎖が付加されたポリペプチドを得ることができる。

以上のようにして得られる本発明の形質転換体を培地に培養し、培養物中に本発明のポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、本発明のポリペプチドを製造することができる。

本発明の形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

本発明の形質転換体が大腸菌等の原核生物あるいは酵母等の真核生物を宿主として得られた形質転換体である場合、該形質転換体を培養する培地として、該形質転換体が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、該形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

炭素源としては、該形質転換体が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含有する糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノールなどのアルコール類等を用いることができる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、ならびに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等を用いることができる。

無機塩としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。



培養は、振盪培養または深部通気攪拌培養などの好気的条件下で行う。培養温度は15～40℃がよく、培養時間は、通常16時間～7日間である。培養中のpHは3.0～9.0に保持することが好ましい。pHの調整は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。

また、培養中必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド等を、trpプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI1640培地〔The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)〕、EagleのMEM培地〔Science, 122, 501 (1952)〕、ダルベッコ改変MEM培地〔Virology, 8, 396 (1959)〕、199培地〔Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)〕またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。

培養は、通常pH6～8、30～40℃、5%CO<sub>2</sub>存在下等の条件下で1～7日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地(PharMingen社製)、Sf-900 II SFM培地(Life Technologies社製)、ExCell400、ExCell405(いずれもJRH Biosciences社製)、Grace's Insect Medium〔Nature, 195, 788 (1962)〕等を用いることができる。

培養は、通常pH6～7、25～30℃等の条件下で、1～5日間行う。

また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよ

い。

植物細胞を宿主として得られた形質転換体は、細胞として、または植物の細胞や器官に分化させて培養することができる。該形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているムラシゲ・アンド・スクーグ(MS)培地、ホワイト(White)培地、またはこれら培地にオーキシン、サイトカイニン等、植物ホルモンを添加した培地等を用いることができる。

培養は、通常pH5～9、20～40℃の条件下で3～60日間行う。

また、培養中に必要に応じて、カナマイシン、ハイグロマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

上記のとおり、本発明のポリペプチドをコードするDNAを組み込んだ組換え体ベクターを保有する微生物、動物細胞、あるいは植物細胞由来の形質転換体を、通常の培養方法に従って培養し、該ポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物より該ポリペプチドを採取することにより、該ポリペプチドを製造することができる。

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クローニング第2版に記載されている方法等に準じて、分泌生産、融合ポリペプチド発現等を行うことができる。

本発明のポリペプチドの生産方法としては、宿主細胞内に生産させる方法、宿主細胞外に分泌させる方法、あるいは宿主細胞外膜上に生産させる方法があり、使用する宿主細胞や、生産させるポリペプチドの構造を変えることにより、該方法を選択することができる。

本発明のポリペプチドが宿主細胞内あるいは宿主細胞外膜上に生産される場合、ボールソンらの方法〔J. Biol. Chem., 264, 17619 (1989)〕、ロウらの方法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 8227 (1989)、Genes Develop., 4, 1288 (1990)〕、または特開平5-336963、WO94/23021等に記載の方法を準用することにより、該ポリペプチドを宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

すなわち、遺伝子組換えの手法を用いて、本発明のポリペプチドの活性部位を含むポリペプチドの手前にシグナルペプチドを付加した形で発現させることにより、本発明のポリペプチドを宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

また、特開平2-227075に記載されている方法に準じて、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子等を用いた遺伝子増幅系を利用して生産量を上昇させることもできる。

さらに、遺伝子導入した動物または植物の細胞を再分化させることにより、遺伝子が導入された動物個体（トランスジェニック非ヒト動物）または植物個体（トランスジェニック植物）を造成し、これらの個体を用いて本発明のポリペプチドを製造することもできる。

形質転換体が動物個体または植物個体の場合は、通常の方法に従って、飼育または栽培し、該ポリペプチドを生成蓄積させ、該動物個体または植物個体より該ポリペプチドを採取することにより、該ポリペプチドを製造することができる。

動物個体を用いて本発明のポリペプチドを製造する方法としては、例えば公知の方法〔American Journal of Clinical Nutrition, 63, 639S (1996)、American Journal of Clinical Nutrition, 63, 627S (1996)、Bio/Technology, 9, 830 (1991)〕に準じて遺伝子を導入して造成した動物中に本発明のポリペプチドを生産する方法があげられる。

動物個体の場合は、例えば、本発明のポリペプチドをコードするDNAを導入したトランスジェニック非ヒト動物を飼育し、該ポリペプチドを該動物中に生成・蓄積させ、該動物中より該ポリペプチドを採取することにより、該ポリペプチドを製造することができる。該動物中の生成・蓄積場所としては、例えば、該動物のミルク（特開昭63-309192）、卵等をあげることができる。この際に用いられるプロモーターとしては、動物で発現できるものであればいずれも用いることができるが、例えば、乳腺細胞特異的なプロモーターである $\alpha$ カゼインプロモーター、 $\beta$ カゼインプロモーター、 $\beta$ ラクトグロブリンプロモーター、ホエー酸性プロテインプロモーター等が好適に用いられる。

植物個体を用いて本発明のポリペプチドを製造する方法としては、例えば本発明のポリペプチドをコードするDNAを導入したトランスジェニック植物を公知の方法〔組織培養, 20 (1994)、組織培養, 21 (1995)、Trends in Biotechnology, 15, 45 (1997)〕に準じて栽培し、該ポリペプチドを該植物中に生成・蓄積させ、該植物中より該ポリペプチドを採取することにより、該ポリペプチドを生産する方法が

あげられる。

本発明の形質転換体により製造されたポリペプチドを単離精製するためには、通常の酵素の単離精製法を用いることができる。例えば本発明のポリペプチドが、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し、水系緩衝液にけん濁後、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られる上清から、通常の酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル (DEAE) セファロース、DIAION HPA-75 (三菱化成社製) 等のレジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF (Pharmacia社製) 等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

また、該ポリペプチドが細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後、破碎し、遠心分離を行うことにより、沈殿画分としてポリペプチドの不溶体を回収する。回収したポリペプチドの不溶体を蛋白質変性剤で可溶化する。該可溶化液を希釈または透析し、該可溶化液中の蛋白質変性剤の濃度を下げることにより、該ポリペプチドを正常な立体構造に戻す。該操作の後、上記と同様の単離精製法により該ポリペプチドの精製標品を得ることができる。

本発明のポリペプチド、あるいは該ポリペプチドに糖鎖の付加されたポリペプチド等の誘導体が細胞外に分泌された場合には、培養上清に該ポリペプチドあるいは該ポリペプチドの誘導体を回収することができる。即ち、該培養物を上記と同様の遠心分離等の手法により処理することにより培養上清を取得し、該培養上清から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を得ることができる。

このようにして取得されるポリペプチドとして、例えば、配列番号 1 記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドをあげることができる。

また、本発明のポリペプチドは、Fmoc法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、tBoc法（tert-ブチルオキシカルボニル法）等の化学合成法によっても製造することができる。また、Advanced ChemTech社、パーキン・エルマー社、Pharmacia社、Protein Technology Instrument社、Synthecell-Vega社、PerSeptive社、島津製作所等のペプチド合成機を利用して化学合成することもできる。

#### （４）本発明のDNAを利用した物質の製造法

（a）芳香族アミノ酸や芳香族ビタミン等の芳香族化合物、プリンヌクレオチドやピリミジンヌクレオチド等の核酸関連物質、L-ヒスチジン、あるいはリボフラビン等の製造

本発明のDNAやその塩基配列情報を用いることにより、芳香族アミノ酸や芳香族ビタミン等の芳香族化合物、プリンヌクレオチドやピリミジンヌクレオチド等の核酸関連物質、L-ヒスチジン、あるいはリボフラビン等の生産能を有する形質転換体のトランスアルドラーゼ活性を所望に改変することが可能となり、それによりそれら代謝産物の工業的に有利な製造法を提供することができる。

本発明により得ることのできる芳香族アミノ酸とはフェニルアラニン、チロシン、トリプトファンなどのアミノ酸をいい、芳香族ビタミンとは、葉酸（ビタミンM）、メナキノン（ビタミンK<sub>2</sub>）、p-ヒドロキシ安息香酸またはそれに由来するユビキノン、p-アミノ安息香酸（ビタミンH<sup>+</sup>）、アンスラニル酸（ビタミンL）、トコフェロール（ビタミンE）などをいい、核酸関連物質とはプリンヌクレオチド、ピリミジンヌクレオチド、プリンヌクレオシド、ピリミジンヌクレオシド、プリン塩基、ピリミジン塩基、フラビンヌクレオチド等の物質をいう。

これらの物質の製造法を以下に述べる。

上記（３）で作製した形質転換体において、本発明のDNAまたは本発明のDNAの上流に存在し該DNAの転写・翻訳に関わるDNAの有する塩基配列中に1以上の塩基が欠失、置換若しくは付加されたDNAを保有する形質転換体（以下、形質転換体の変異体と略す）の中から、トランスアルドラーゼの活性が増強された形質転換体、またはトランスアルドラーゼ活性が低下または欠失した形質転換体を選択する。該欠失、置換若しくは付加は公知の方法（モレキュラークローニング 第

2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーなどに記載の方法)に準じて行うことができる。

トランスアルドラーゼ活性の測定は、下記実施例(4)に従って行うことができる。

すなわち、形質転換体の変異体を上記(3)の方法に従い培養し、粗酵素液を調製する。トリス 40mmol/l (pH7.6)、ジホスホビリジン 0.1mmol/l、フルクトース 6ーリン酸 2.8mmol/l、エリスロース 4ーリン酸 0.2mmol/l、グリセロールー 3ーリン酸ーデヒドロゲナーゼおよびトリオースフォスフェートーイソメラーゼ混合液(ベーリンガー マンハイム社製)10 $\mu$ gを含む反応液に該粗酵素液を加えて1mlとし、25°Cで反応させる。該反応により生成したグリセルアルデヒドー 3ーリン酸を、分光光度計を用いて340nmにおける吸光度の減少を測定することにより活性を測定することができる。

該活性測定方法で、形質転換体の変異体のトランスアルドラーゼ活性を測定し、トランスアルドラーゼ活性が向上または低下あるいは欠失した形質転換体の変異体を選択することにより目的とする形質転換体を得ることができる。

芳香族アミノ酸または芳香族ビタミンの生産菌が宿主である場合は、トランスアルドラーゼ活性を増強することにより、それら芳香族化合物の生産効率を向上させることができる。

また、プリンヌクレオチドやピリミジンヌクレオチド等の核酸関連物質、L-ヒスチジン、あるいはリボフラビン等の生産菌が宿主である場合は、トランスアルドラーゼ活性を低下または欠失させることにより、それらの生産効率を向上させることができる。

このようにして得られた形質転換体を培地に培養し、培養物中に芳香族アミノ酸、芳香族ビタミン、L-ヒスチジン、リボフラビン、プリンヌクレオチドやピリミジンヌクレオチド等の核酸関連物質などを生成蓄積させ、該培養物から濃縮晶析法、活性炭処理法、あるいはイオン交換樹脂法等の公知の方法〔遠藤 勲ら、化学工学会(編)「バイオセパレーションプロセス便覧」、共立出版(1996)〕を用いて、該物質を単離・精製することにより、目的とする物質を効率よく生産することができる。

る。

該形質転換体の培養は、上記（３）記載の本発明のポリペプチドを製造するための形質転換体の培養方法と同様な方法で行うことができる。

#### (b) 新規な糖の製造

上記方法により得られた形質転換体、該形質転換体の培養物または該培養物の処理物を酵素源として用い、ケトースおよびアルドースを水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中にトランスアルドラーゼ活性により該アルドースに該ケトースのジヒドロキシアセトン部分の転移された糖を生成蓄積させ、該水性媒体から該糖を採取することもできる。

該ケトースとしては例えば、セドヘプツロース 7-リン酸、フルクトース 6-リン酸等があげられ、該アルドースとしては例えば、エリスロース 4-リン酸、グリセルアルデヒド 3-リン酸などがあげられる。

形質転換体の培養物の処理物としては、培養菌体、該菌体の乾燥物、該菌体の凍結乾燥物、該菌体の界面活性剤処理物、該菌体の酵素処理物、該菌体の超音波処理物、該菌体の機械的摩砕物、該菌体の溶媒処理物等の菌体処理物、菌体の蛋白分画物、菌体および菌体処理物の固定化物等、該菌体より抽出して得られる酵素標品などをあげることができる。

本発明により得られる糖の生成において用いられる酵素源は、37℃で1分間に1ミリモルの本発明により得られる糖を生成することのできる活性を1単位(U)として、1mU/l~1,000U/lであり、好ましくは10mU/l~100U/lの濃度で用いる。

本発明により得られる糖の生成において用いられる水性媒体としては、水、りん酸塩、炭酸塩、酢酸塩、ほう酸塩、クエン酸塩、トリスなどの緩衝液、メタノール、エタノールなどのアルコール類、酢酸エチルなどのエステル類、アセトンなどのケトン類、アセトアミドなどのアミド類などをあげることができる。また、酵素源として用いた形質転換体の培養液を水性媒体として用いることができる。

本発明により得られる糖の生成において、必要に応じて界面活性剤あるいは有機溶媒を添加してもよい。界面活性剤としては、ポリオキシエチレン・オクタデシルアミン（例えばナイミーンS-215、日本油脂社製）などの非イオン界面活性剤、セ

チルトリメチルアンモニウム・ブロマイドやアルキルジメチル・ベンジルアンモニウムクロライド（例えばカチオンF2-40E、日本油脂社製）などのカチオン系界面活性剤、ラウロイル・サルコシネートなどのアニオン系界面活性剤、アルキルジメチルアミン（例えば三級アミンFB、日本油脂社製）などの三級アミン類など、ガラクトース含有糖質の生成を促進するものであればいずれでもよく、1種または数種を混合して使用することもできる。界面活性剤は、通常0.1~50g/lの濃度で用いられる。有機溶剤としては、キシレン、トルエン、脂肪族アルコール、アセトン、酢酸エチルなどが挙げられ、通常0.1~50ml/lの濃度で用いられる。

水性媒体中に生成した本発明により得られる糖の定量はDionex社製の糖分析装置などを用いて行うことができる[Anal. Biochem., 189, 151 (1990)]。

反応液中に生成した本発明により得られる糖の採取は、活性炭やイオン交換樹脂などを用いる通常の方法によって行うことができる。

該方法を用いることにより、従来は合成することが困難であった糖の合成が容易に出来るようになり、また、新規な糖を合成することも可能となる。

以下に本発明の実施例を示すが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

#### 発明を実施するための最良の形態

(1) コリネバクテリウム グルタミクムのトランスケトララーゼ欠損変異株の取得

コリネバクテリウム グルタミクム L 2 2 [野生型株ATCC31833から誘導されたリゾチーム感受性変異株; R. Katsumata et al., Proc. 4th Eur. Congr. Biotechnol., 4, 767 (1987)]をNB培地[粉末ブイヨン20g、酵母エキス5gを水1Lに含み、pH7.2に調整した培地]3ml中に植菌し、30°CでOD<sub>660</sub>が約0.6になるまで培養した。

培養後、遠心分離により集菌し、得られた菌体を50mmol/lトリスマレイン酸緩衝液(pH6.0)で一回洗浄し、NTG400mg/Lを含む同緩衝液3ml中、室温で20分間変異処理を行った。該処理菌体を同緩衝液で2回遠心洗浄後、NB培地3ml中、30°Cで1時間培養した。



該培養液を生理食塩水で $10^{-5}$ ~ $10^{-6}$ に希釈し、得られた希釈液0.1mlをNB寒天培地[NB培地に寒天を1.4%含む培地、pH7.2]に塗布し、30°Cで2日間培養した。

寒天培地上に生育してきたコロニーを、最少寒天培地M 1 [グルコース 10g、 $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$  1g、KCl 0.2g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  10mg、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \sim 6\text{H}_2\text{O}$  0.2mg、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.9mg、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.4mg、 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  0.09mg、 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.04mg、ビオチン 50mg、p-アミノ安息香酸 2.5mg、チアミン塩酸塩 1mgおよび寒天 16gを水1Lに含み、pH7.2に調整した培地]およびシキミ酸50mg/Lを含むM 1 寒天培地に各々塗布し、30°Cで培養した。

最少寒天培地M 1 では生育せず、シキミ酸50mg/Lを含むM 1 寒天培地で生育できる株を、シキミ酸要求変異株として分離した。分離されたシキミ酸要求変異株を、シキミ酸50mg/Lを含むM 1 寒天培地および該培地中のグルコースをリボースに置き換えた培地に各々塗布し、30°Cで培養した。

該シキミ酸要求変異株の中で、シキミ酸50mg/Lを含むM 1 寒天培地で生育するが、該培地中のグルコースをリボースに置き換えた培地では生育できない株を、シキミ酸要求性でかつリボース非資化性の変異株として分離した。

分離されたシキミ酸要求性でかつリボース非資化性の変異株を、シキミ酸50mg/Lを含むM 1 培地40ml中30°Cで24時間培養後、遠心分離して得た菌体を超音波破碎し、遠心分離することで無細胞抽出液を調製した。該無細胞抽出液を粗酵素液として、トランスケトラーゼの活性を以下のようにして測定した。

トリス 50mmol/l (pH7.5)、NADH 0.2mmol/l、チアミンピロリン酸0.01mmol/l、 $\text{MgCl}_2$  1mmol/l、キシロース-5-リン酸 0.5mmol/l、リブローズ-5-リン酸 0.5mmol/l、グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼおよびトリオースフォスフェートイソメラーゼ混合液（ベーリンガー・マンハイム社製）10 $\mu\text{g}$ を含む反応液に粗酵素液を加えて1.5mlとし、30°Cで反応を行った。

分光光度計を用いて340nmにおけるNADHの吸光度の減少を測定することにより、生成されるグリセルアルデヒド-3-リン酸量を測定した。

該測定により、分離されたシキミ酸要求性でかつリボース非資化性の変異株より、グリセルアルデヒド-3-リン酸を全く生成しない、トランスケトラーゼ活性を欠損

した変異株TKT6株を選択した。

コリネバクテリウム グルタミカム TKT6株は、ブダペスト条約に基づいて、平成10年6月30日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所、日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305-8566）にFERM BP-6399号として寄託されている。

(2) トランスケトラーゼ遺伝子およびトランスアルドラーゼ遺伝子を含むDNA断片のクローニング

両遺伝子の供給源としてコリネバクテリウム・グルタミカムATCC31833の染色体DNAを、該遺伝子の受容菌として実施例1にて取得したコリネバクテリウム・グルタミカムのトランスケトラーゼ遺伝子欠損株TKT6(FERM BP-6399)を用いた。ベクターは、コリネバクテリウム・グルタミカムで複製可能なプラスミドpCSEK20を用いた。pCSEK20は、コリネバクテリウム・グルタミカム由来のプラスミドpCG2（特開昭58-35197）の複製開始点、同じくコリネバクテリウム・グルタミカム由来のプラスミドpCG4（特開昭57-183799）のスペクチノマイシンおよびストレプトマイシン耐性遺伝子、およびエシェリヒア・コリの一般的ベクターであるpGA22[J. Bacteriol., 140, 400(1979)]のカナマイシン耐性遺伝子から成るプラスミドである [Appl. Microbiol. Biotechnol., 51, 201 (1999)]。

コリネバクテリウム・グルタミカムATCC31833の培養および培養菌体からの染色体DNAの調製は、特開平6-169785記載の方法に従って行った。pCSEK20 は、これを保有させたコリネバクテリウム・グルタミカムATCC31833の培養菌体から特開平6-169785記載のベクターの調製方法に従って単離した。

コリネバクテリウム・グルタミカムATCC31833の染色体DNAからのトランスケトラーゼ遺伝子およびトランスアルドラーゼ遺伝子を含むDNA断片のクローニングは、以下のようにして行った。

上記のように調製した染色体DNAおよびpCSEK20プラスミドDNA各々1 $\mu$ gをEcoRI（5単位）で切断し、両切断物を宝酒造社製ライゲーションキットを用いて連結処理した。このようにして構築されたプラスミドを用いて、シキミ酸要求性を示すコリネバクテリウム・グルタミカムのトランスケトラーゼ遺伝子欠損株

TKT6(FERM BP-6399)を以下の方法で形質転換した。

コリネバクテリウム・グルタミクムTKT6を、NB培地5ml中に植菌し、30°Cで1日培養した種培養液4mlをシキミ酸100 $\mu$ g/mlを含むSSM培地〔グルコース20g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  10g、尿素3g、酵母エキス1g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1g、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.4g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  10mg、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \sim 6\text{H}_2\text{O}$  0.2mg、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.9mg、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.4mg、 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  0.09mg、 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.04mg、ビオチン30 $\mu$ gおよびサイアミン塩酸塩1mgを水1lに含み、pH7.2に調整した培地〕40mlに植菌し、30°CでOD<sub>660</sub>が0.6になるまで振とう培養した。

菌体を集菌し、該細胞をRCGP培地〔グルコース5g、カザミノ酸5g、酵母エキス2.5g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5g、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.41g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  10mg、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \sim 6\text{H}_2\text{O}$  2mg、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.9mg、 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.04mg、ビオチン30 $\mu$ gおよびサイアミン塩酸塩2mg、コハク酸二ナトリウム135g、ポリビニルピロリドン（分子量10,000）30gを水1lに含む培地〕のリゾチームを含む溶液）10mlに約 $10^9$ 細胞/mlとなるように懸濁し、L型試験管に移して30°Cで6時間穏やかに振とうし反応させてプロトプラスト化した。

このプロトプラスト菌液0.5mlを小試験管にとり、2,500 $\times$ gで5分間遠心分離し、TSMC緩衝液( $\text{MgCl}_2$  10mmol/l、 $\text{CaCl}_2$  30mmol/l、トリス50mmol/l、シヨ糖400mmol/l、pH7.5) 1mlに再懸濁して遠心洗浄後、TSMC緩衝液0.1mlに再懸濁した。この菌液に2倍濃度のTSMC緩衝液と上記連結混合液の1対1混合液100 $\mu$ lを加えて混和し、ついでTSMC緩衝液中に20%PEG6,000を含む液0.8mlを添加して混合した。3分後、RCGP培地 (pH7.2) 2mlを添加し、2,500 $\times$ gで5分間遠心分離にかけて上澄み液を除去し、沈殿したプロトプラストを1mlのRCGP培地に懸濁した。該懸濁液0.2mlをカナマイシン200 $\mu$ g/mlを含むRCGP寒天培地(RCGP培地に1.4%寒天を含む培地、pH7.2) に塗布し、30°Cで10日間培養した。

寒天培地上に生育したコロニーをかき集め、生理食塩水で2回遠心洗浄後、生理食塩水1mlに懸濁した。この菌液をカナマイシン20 $\mu$ g/mlを含有する最少寒天培地M1〔グルコース10g、 $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$  1g、KCl 0.2g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  10mg、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \sim 6\text{H}_2\text{O}$  0.2mg、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.9mg、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.4mg、 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  0.09mg、 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.04mg、ビオチン50 $\mu$ g、P-アミノ安息香酸2.5mg、サイアミン塩酸塩1mgおよび寒天16gを水1lに含み、pH7.2に調整した培地〕上に再塗布

して30°Cで3日間培養し、カナマイシン耐性で、シキミ酸非要求性となった形質転換株を選択した。

これらの形質転換株から特開平6-169785記載のベクターの調製方法に従ってプラスミドDNAを単離した。形質転換株の一株から得られ、pCTK60と命名したプラスミドは、各制限酵素による切断産物をアガロースゲル電気泳動法で解析した結果、pCSEK20のEcoRI部位に約7.6kbのEcoRIDNA断片が挿入された構造を有していることがわかった。サブクローニングと相補試験の結果、同DNA断片内の約4.1kbのXhoI-EcoRIDNA断片上に、少なくともトランスクリプターゼ遺伝子が存在することがわかった。

### (3) XhoI-EcoRIDNA断片の塩基配列決定

上記約4.1kbのXhoI-EcoRIDNA断片を含有するプラスミドから常法に従って該DNA断片を回収した。該DNA断片およびベクターpUC19（宝酒造社製）を種々の制限酵素を用いて分解後、T4DNAリガーゼを用いてベクターDNA断片と分解DNA断片とを結合させた。得られた連結混合液を用いて、常法に従い大腸菌DH5 $\alpha$ （東洋紡社製）を形質転換した。得られた形質転換菌をアンピシリンを最終濃度で100 $\mu$ g/ml含有するLB寒天培地〔トリプトン 10g、酵母エキス 5g、NaCl 10g、寒天 20gを水1lに溶解した培地〕に塗布し、37°Cで16時間培養した。

選択培地上に生育した菌株を、アンピシリンを最終濃度で100 $\mu$ g/ml含有するLB培養液に植菌し、30°Cで12時間培養した。培養菌体からアルカリーSDS法（モレキュラー・クローニング 第2版）によりプラスミドを抽出した。

抽出したプラスミドDNAを用いて、ジデオキシヌクレオシド酵素法によりベクターpUC19に挿入された各種DNA断片の塩基配列を決定した。具体的には、アマシャム社製サーモ・シーケナーゼ・サイクル・シーケンス・キット（Thermo Sequenase cycle sequencing kit; Amersham）を用いてプロトコルに従い反応させた後、ライ・コア社製DNAシーケンサー LONG READER 4200を用いて挿入DNA断片の塩基配列を決定した。該挿入DNA断片の塩基配列を配列番号3に示した。

これら配列の解析は、ソフトウェア・デベロップメント社製のシーケンス解析ソフト ジェネチック・マック（GENETYX MAC）ATSQ 3.0を用いて行った。

その結果、4.1kbのXhoI-EcoRIDNA断片の塩基配列中には、2つのオープンリーディングフレームが存在することが分かった。

それらの塩基配列から推定されるアミノ酸の一次構造を、分類学的にコリネバクテリウム属と近縁のマイコバクテリウム・ツベルクロシスのトランスケトララーゼおよびトランスアルドラーゼのアミノ酸一次構造と比較した結果、配列表の配列番号3記載の塩基配列中373番目から2472番目までのオープンリーディングフレームがトランスケトララーゼ遺伝子であり、2643番目から3722番目までのオープンリーディングフレームがトランスアルドラーゼ遺伝子であることが判明した。該トランスアルドラーゼ遺伝子のオープンリーディングフレームから推測されるアミノ酸配列を配列番号1に、塩基配列を配列番号2に示した。

#### (4) トランスケトララーゼおよびトランスアルドラーゼの活性測定

上記約4.1kbのXhoI-EcoRIDNA断片の両末端を常法に従って平滑末端に修復後、コリネバクテリウム・グルタミクムで複製可能なベクターpCG116 [Appl. Microbiol. Biotechnol., 51, 201 (1999)]のSmaI部位に挿入して、組換え体プラスミドpHTK65を構築した。コリネバクテリウム・グルタミクムATCC31833を該組換え体プラスミドで形質転換し、該形質転換株のトランスケトララーゼおよびトランスアルドラーゼの活性を測定した。トランスケトララーゼ活性は特開平6-169785記載の方法に従って測定した。トランスアルドラーゼ活性は、以下のようにして測定した。

トリス 40mmol/l (pH7.6)、ジホスホピリジン 0.1mmol/l、フルクトース 6ーリン酸 2.8mmol/l、エリスロース 4ーリン酸 0.2mmol/l、グリセロール 3ーリン酸 ーデヒドロゲナーゼおよびトリオースフォスフェートーイソメラーゼ混合液(ペーリンガー マンハイム社製)10μgを含む反応液に粗酵素液を加えて1mlとし、25℃で反応を開始した。生成したグリセルアルデヒド 3ーリン酸を、分光光度計を用いて340nmにおける吸光度の減少を測定することにより定量した。その結果、ATCC31833株のトランスケトララーゼおよびトランスアルドラーゼの単位蛋白質重量および単位時間あたりの活性をそれぞれ1とした時のpHTK65を保有する形質転換株の活性は、いずれも5倍以上に増加していた。

産業上の利用可能性

本発明で新規に見い出されたトランスアルドラーゼ遺伝子、その塩基配列情報、該遺伝子にコードされるポリペプチド、またはそのアミノ酸配列情報を用いることにより、アミノ酸発酵等で広く用いられている産業上重要なコリネバクテリウム属に属する微生物のトランスアルドラーゼを所望に改変した発酵生産菌を育種することができる。さらに、糖類やその誘導体の合成など、立体選択的な炭素-炭素結合形成反応に有用なトランスアルドラーゼ高活性株を育種することができる。

請求の範囲

1. 配列番号 1 記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。
2. 配列番号 1 記載のポリペプチドにおいて、1 以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつトランスアルドラーゼ活性を有するポリペプチド。
3. 配列番号 1 記載のアミノ酸配列と 60% 以上の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつトランスアルドラーゼ活性を有する蛋白質。
4. 請求項 1～3 いずれか 1 項に記載のポリペプチドをコードする DNA。
5. 配列番号 2 記載の塩基配列を有する DNA。
6. 請求項 4 または 5 記載の DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA であり、かつトランスアルドラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする DNA。
7. 請求項 4～6 いずれか一項に記載の DNA をベクターに組み込んで得られる組換え体 DNA。
8. 請求項 7 記載の組換え体 DNA を保有する形質転換体。
9. 請求項 8 記載の形質転換体が保有する請求項 4～6 いずれか 1 項に記載の DNA、または該 DNA の上流に存在する転写・翻訳に関わる DNA の塩基配列中に 1 以上の塩基が置換、欠失若しくは挿入され、かつ該置換、欠失若しくは挿入前に比べてトランスアルドラーゼの活性が増強された形質転換体。
10. 形質転換体が、芳香族アミノ酸または芳香族ビタミンを生産する能力を有する形質転換体である、請求項 8 または 9 記載の形質転換体。
11. 請求項 10 記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中に芳香族アミノ酸または芳香族ビタミンを生成蓄積させ、該培養物より該物質を採取することを特徴とする、該物質の製造法。
12. 請求項 8 記載の形質転換体が保有する請求項 4～6 いずれか 1 項に記載の DNA、または該 DNA の上流に存在する転写・翻訳に関わる DNA の塩基配列中に 1 以上の塩基が置換、欠失若しくは挿入され、かつ該置換、欠失若しくは挿入前に比べてトランスアルドラーゼの活性が低下または欠損した形質転換体。

13. 形質転換体が、L-ヒスチジン、リボフラビン、核酸および核酸関連物質から選ばれる物質を生産する能力を有する形質転換体である、請求項 8 または 12 記載の形質転換体。

14. 請求項 13 記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中に L-ヒスチジン、リボフラビン、核酸および核酸関連物質から選ばれる物質を生成蓄積させ、該培養物より該物質を採取することを特徴とする、該物質の製造法。

15. 請求項 8 記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中に請求項 1～3 いずれか 1 項に記載のポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物より該ポリペプチドを採取することを特徴とする、請求項 1～3 いずれか 1 項に記載のポリペプチドの製造法。

16. 請求項 8 または 9 記載の形質転換体、該形質転換体の培養物または該培養物の処理物を酵素源として用い、ケトースおよびアルドースを水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に該アルドースに該ケトースのジヒドロキシアセトン部分の転移された糖を生成蓄積させ、該水性媒体から該糖を採取することを特徴とする、該糖の製造法。



1/12

配列表  
SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD

&lt;120&gt; Novel Transaldolase

&lt;130&gt; 11236W01

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;150&gt; JP 99/266548

&lt;151&gt; 1999-09-21

&lt;160&gt; 3

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 360

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Corynebacterium glutamicum ATCC31388

&lt;400&gt; 1

atg	tct	cac	att	gat	gat	ctt	gca	cag	ctc	ggc	act	tcc	act	tgg	ctc	48
Met	Ser	His	Ile	Asp	Asp	Leu	Ala	Gln	Leu	Gly	Thr	Ser	Thr	Trp	Leu	
1				5					10					15		

gac	gac	ctc	tcc	cgc	gag	cgc	att	act	tcc	ggc	aat	ctc	agc	cag	gtt	96
Asp	Asp	Leu	Ser	Arg	Glu	Arg	Ile	Thr	Ser	Gly	Asn	Leu	Ser	Gln	Val	
			20					25					30			

att	gag	gaa	aag	tct	gta	gtc	ggt	gtc	acc	acc	aac	cca	gct	att	ttc	144
Ile	Glu	Glu	Lys	Ser	Val	Val	Gly	Val	Thr	Thr	Asn	Pro	Ala	Ile	Phe	
		35					40						45			

gca	gca	gca	atg	tcc	aag	ggc	gat	tcc	tac	gac	gct	cag	atc	gca	gag	192
Ala	Ala	Ala	Met	Ser	Lys	Gly	Asp	Ser	Tyr	Asp	Ala	Gln	Ile	Ala	Glu	
		50					55					60				

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

2/12

ctc aag gcc gct ggc gca tct gtt gac cag gct gtt tac gcc atg agc 240  
Leu Lys Ala Ala Gly Ala Ser Val Asp Gln Ala Val Tyr Ala Met Ser  
65 70 75 80

atc gac gat gtt cgc aat gct tgt gat ctg ttc acc ggc atc ttc gag 288  
Ile Asp Asp Val Arg Asn Ala Cys Asp Leu Phe Thr Gly Ile Phe Glu  
85 90 95

tcc tcc aac ggc tac gac ggc cgc gtg tcc atc gag gtt gac cca cgt 336  
Ser Ser Asn Gly Tyr Asp Gly Arg Val Ser Ile Glu Val Asp Pro Arg  
100 105 110

atc tct gct gac cgc gac gca acc ctg gct cag gcc aag gag ctg tgg 384  
Ile Ser Ala Asp Arg Asp Ala Thr Leu Ala Gln Ala Lys Glu Leu Trp  
115 120 125

gca aag gtt gat cgt cca aac gtc atg atc aag atc cct gca acc cca - 432  
Ala Lys Val Asp Arg Pro Asn Val Met Ile Lys Ile Pro Ala Thr Pro  
130 135 140

ggt tct ttg cca gca atc acc gac gct ttg gct gag ggc atc agc gtt 480  
 Gly Ser Leu Pro Ala Ile Thr Asp Ala Leu Ala Glu Gly Ile Ser Val  
 145 150 155 160

aac gtc acc ttg atc ttc tcc gtt gct cgc tac cgc gag gtc atc gct 528  
Asn Val Thr Leu Ile Phe Ser Val Ala Arg Tyr Arg Glu Val Ile Ala  
165 170 175

gcg tac atc gag gga atc aag cag gca gct gca aac ggc cac gac gta 576  
Ala Tyr Ile Glu Gly Ile Lys Gln Ala Ala Ala Asn Gly His Asp Val  
180 185 190

tcc aag atc cac tct gtg gct tcc ttc ttc gtc tcc cgc gtc gac gtt 624  
Ser Lys Ile His Ser Val Ala Ser Phe Phe Val Ser Arg Val Asp Val  
195 200 205

gag atc gac aag cgc ctc gag gca atc gga tcc gat gag gct ttg gct 672  
Glu Ile Asp Lys Arg Leu Glu Ala Ile Gly Ser Asp Glu Ala Leu Ala  
210 215 220

ctg cgc ggc aag gca ggc gtt gcc aac gct cag cgc gct tac gct gtg 720

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

3/12

Leu	Arg	Gly	Lys	Ala	Gly	Val	Ala	Asn	Ala	Gln	Arg	Ala	Tyr	Ala	Val		
225					230					235					240		
tac	aag	gag	ctt	ttc	gac	gcc	gcc	gag	ctg	cct	gaa	ggt	gcc	aac	act	768	
Tyr	Lys	Glu	Leu	Phe	Asp	Ala	Ala	Glu	Leu	Pro	Glu	Gly	Ala	Asn	Thr		
				245					250					255			
cag	cgc	cca	ctg	tgg	gca	tcc	acc	ggc	gtg	aag	aac	cct	gcg	tac	gct	816	
Gln	Arg	Pro	Leu	Trp	Ala	Ser	Thr	Gly	Val	Lys	Asn	Pro	Ala	Tyr	Ala		
				260					265					270			
gca	act	ctt	tac	gtt	tcc	gag	ctg	gct	ggt	cca	aac	acc	gtc	aac	acc	864	
Ala	Thr	Leu	Tyr	Val	Ser	Glu	Leu	Ala	Gly	Pro	Asn	Thr	Val	Asn	Thr		
				275					280					285			
atg	cca	gaa	ggc	acc	atc	gac	gct	gtt	ctg	gaa	ctg	ggc	aac	ctg	cac	912	
Met	Pro	Glu	Gly	Thr	Ile	Asp	Ala	Val	Leu	Glu	Leu	Gly	Asn	Leu	His		
				290				295				300					
ggt	gac	acc	ctg	tcc	aac	tcc	gcg	gca	gaa	gct	gac	gct	gtg	ttc	tcc	960	
Gly	Asp	Thr	Leu	Ser	Asn	Ser	Ala	Ala	Glu	Ala	Asp	Ala	Val	Phe	Ser		
305					310					315					320		
cag	ctt	gag	gct	ctg	ggc	gtt	gac	ttg	gca	gat	gtc	ttc	cag	gtc	ctg	1008	
Gln	Leu	Glu	Ala	Leu	Gly	Val	Asp	Leu	Ala	Asp	Val	Phe	Gln	Val	Leu		
				325					330					335			
gag	acc	gag	ggt	gtg	gac	aag	ttt	gtt	gct	tct	tgg	agc	gaa	ctg	ctt	1056	
Glu	Thr	Glu	Gly	Val	Asp	Lys	Phe	Val	Ala	Ser	Trp	Ser	Glu	Leu	Leu		
				340					345					350			
gag	tcc	atg	gaa	gct	cgc	ctg	aag										
Glu	Ser	Met	Glu	Ala	Arg	Leu	Lys										
				355			360										

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 1080

&lt;212&gt; DNA

<213> *Corynebacterium glutamicum* ATCC31388

&lt;400&gt; 2

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

4/12

atgtctcaca ttgatgatct tgcacagctc ggcacttcca cttggctcga cgacctctcc 60  
cgcgagcgca ttacttcgg caatctcagc caggttattg aggaaaagtc tgtagtcggt 120  
gtcaccacca acccagctat ttctgcagca gcaatgtcca agggcgattc ctacgacgct 180  
cagatcgcag agtcaagge cgctggcgca tctgttgacc aggctgttta cgccatgagc 240  
atcgacgatg ttcgcaatgc ttgtgatctg ttcaccggca tcttcgagtc ctccaacggc 300  
tacgacggcc gcgtgtccat cgaggttgac ccacgtatct ctgctgaccg cgacgcaacc 360  
ctggctcagg ccaaggagct gtgggcaaag gttgatcgtc caaacgtcat gatcaagatc 420  
cctgcaaccc caggttcttt gccagcaatc accgacgctt tggctgaggg catcagcgtt 480  
aacgtcacct tgatcttctc cgttgctcgc taccgcgagg tcatcgctgc gtacatcgag 540  
ggaatcaagc aggcagctgc aaacggccac gacgtatcca agatccactc tgttgcttcc 600  
ttcttcgtct cccgcgtcga cgttgagatc gacaagcgcc tcgaggcaat cggatccgat 660  
gaggcttttg ctctgcgcgg caaggcagge gttgccaacg ctcagcgcg cttacgctgtg 720  
tacaaggagc ttttcgacgc cgccgagctg cctgaagggtg ccaacactca gcgcccactg 780  
tgggcatcca ccggcgtgaa gaacctgcg tacgtgcaa ctctttacgt ttccgagctg 840  
gttggtccaa acaccgtcaa caccatgcc aagggacca tcgacgctgt tctggaactg 900  
ggcaacctgc acggtgacac cctgtccaac tccgcggcag aagctgacgc tgtgttctcc 960  
cagcttgagg ctctgggcgt tgacttgga gatgtcttcc aggtcctgga gaccgagggt 1020  
gtggacaagt ttgttgcttc ttggagcgaa ctgcttgagt ccatggaagc tcgcctgaag 1080

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 4108

&lt;212&gt; DNA

<213> *Corynebacterium glutamicum* ATCC31388

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



5/12

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (373)..(2472)

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (2643)..(3722)

&lt;400&gt; 3

```

tcgagagttt gaaggggtcc gattcgttcc gttcgtgacg ctttgtgagg ttttttgacg 60
ttgcaccgta ttgcttgccg aacatttttc ttttccttcc ggtttttcga gaattttcac 120
ctacaaaagc ccacgtcaca gctcccagac ttaagattgg tcacaccttt gacacatttg 180
aaccacagtt ggttataaaa tgggttcaac atcactatgg ttagaggtgt tgacgggtca 240
gattaagcaa agactacttt cggggtagat cacctttgcc aaatttgaat caattaacct 300
aagtcgtaga tctgatcatc ggatctaacg aaaacgaacc aaaactttgg tcccggttta 360
accaggaag ga atg acc acc ttg acg ctg tca cct gaa ctt cag gcg etc 411
      Met Thr Thr Leu Thr Leu Ser Pro Glu Leu Gln Ala Leu
          1             5             10

act gta cgc aat tac ccc tct gat tgg tcc gat gtg gac acc aag gct 459
Thr Val Arg Asn Tyr Pro Ser Asp Trp Ser Asp Val Asp Thr Lys Ala
      15             20             25

gta gac act gtt cgt gtc ctc gct gca gac gct gta gaa aac tgt ggc 507
Val Asp Thr Val Arg Val Leu Ala Ala Asp Ala Val Glu Asn Cys Gly
      30             35             40             45

tcc ggc cac cca ggc acc gca atg agc ctg gct ccc ctt gca tac acc 555
Ser Gly His Pro Gly Thr Ala Met Ser Leu Ala Pro Leu Ala Tyr Thr
          50             55             60

ttg tac cag cgg gtt atg aac gta gat cca cag gac acc aac tgg gca 603
Leu Tyr Gln Arg Val Met Asn Val Asp Pro Gln Asp Thr Asn Trp Ala
          65             70             75

ggc cgt gac cgc ttc gtt ctt tct tgt ggc cac tcc tct ttg acc cag 651
Gly Arg Asp Arg Phe Val Leu Ser Cys Gly His Ser Ser Leu Thr Gln
          80             85             90

```

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

6/12

tac atc cag ctt tac ttg ggt gga ttc ggc ctt gag atg gat gac ctg	699
Tyr Ile Gln Leu Tyr Leu Gly Gly Phe Gly Leu Glu Met Asp Asp Leu	
95 100 105	
aag gct ctg cgc acc tgg gat tcc ttg acc cca gga cac cct gag tac	747
Lys Ala Leu Arg Thr Trp Asp Ser Leu Thr Pro Gly His Pro Glu Tyr	
110 115 120 125	
cgc cac acc aag ggc gtt gag atc acc act ggc cct ctt ggc cag ggt	795
Arg His Thr Lys Gly Val Glu Ile Thr Thr Gly Pro Leu Gly Gln Gly	
130 135 140	
ctt gca tct gca gtt ggt atg gcc atg gct gct cgt cgt gag cgt ggc	843
Leu Ala Ser Ala Val Gly Met Ala Met Ala Ala Arg Arg Glu Arg Gly	
145 150 155	
cta ttc gac cca acc gct gct gag ggc gaa tcc cca ttc gac cac cac	891
Leu Phe Asp Pro Thr Ala Ala Glu Gly Glu Ser Pro Phe Asp His His	
160 165 170	
atc tac gtc att gct tct gat ggt gac ctg cag gaa ggt gtc acc tct	939
Ile Tyr Val Ile Ala Ser Asp Gly Asp Leu Gln Glu Gly Val Thr Ser	
175 180 185	
gag gca tcc tcc atc gct ggc acc cag cag ctg ggc aac ctc atc gtg	987
Glu Ala Ser Ser Ile Ala Gly Thr Gln Gln Leu Gly Asn Leu Ile Val	
190 195 200 205	
ttc tgg gat gac aac cgc atc tcc atc gaa gac aac act gag atc gct	1035
Phe Trp Asp Asp Asn Arg Ile Ser Ile Glu Asp Asn Thr Glu Ile Ala	
210 215 220	
ttc aac gag gac gtt gtt gct cgt tac aag gct tac ggc tgg cag acc	1083
Phe Asn Glu Asp Val Val Ala Arg Tyr Lys Ala Tyr Gly Trp Gln Thr	
225 230 235	
att gag gtt gag gct ggc gag gac gtt gca gca atc gaa gct gca gtg	1131
Ile Glu Val Glu Ala Gly Glu Asp Val Ala Ala Ile Glu Ala Ala Val	
240 245 250	
gct gag gct aag aag gac acc aag cga cct acc ttc atc cgc gtt cgc	1179

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

7/12

Ala	Glu	Ala	Lys	Lys	Asp	Thr	Lys	Arg	Pro	Thr	Phe	Ile	Arg	Val	Arg		
255						260					265						
acc	atc	atc	ggc	ttc	cca	gct	cca	acc	atg	atg	aac	acc	ggg	gct	gtg	1227	
Thr	Ile	Ile	Gly	Phe	Pro	Ala	Pro	Thr	Met	Met	Asn	Thr	Gly	Ala	Val		
270					275				280					285			
cac	ggg	gct	gct	ctt	ggc	gca	gct	gag	gtt	gca	gca	acc	aag	act	gag	1275	
His	Gly	Ala	Ala	Leu	Gly	Ala	Ala	Glu	Val	Ala	Ala	Thr	Lys	Thr	Glu		
				290				295						300			
ctt	gga	ttc	gat	cct	gag	gct	cac	ttc	gcg	atc	gac	gat	gag	gtt	atc	1323	
Leu	Gly	Phe	Asp	Pro	Glu	Ala	His	Phe	Ala	Ile	Asp	Asp	Glu	Val	Ile		
			305				310						315				
gct	cac	acc	cgc	tcc	ctc	gca	gag	cgc	gct	gca	cag	aag	aag	gct	gca	1371	
Ala	His	Thr	Arg	Ser	Leu	Ala	Glu	Arg	Ala	Ala	Gln	Lys	Lys	Ala	Ala		
		320				325					330						
tgg	cag	gtc	aag	ttc	gat	gag	tgg	gca	gct	gcc	aac	cct	gag	aac	aag	1419	
Trp	Gln	Val	Lys	Phe	Asp	Glu	Trp	Ala	Ala	Ala	Asn	Pro	Glu	Asn	Lys		
	335					340					345						
gct	ctg	ttc	gat	cgc	ctg	aac	tcc	cgt	gag	ctt	cca	gcg	ggc	tac	gct	1467	
Ala	Leu	Phe	Asp	Arg	Leu	Asn	Ser	Arg	Glu	Leu	Pro	Ala	Gly	Tyr	Ala		
350					355					360					365		
gac	gag	ctc	cca	aca	tgg	gat	gca	gat	gag	aag	ggc	gtc	gca	act	cgt	1515	
Asp	Glu	Leu	Pro	Thr	Trp	Asp	Ala	Asp	Glu	Lys	Gly	Val	Ala	Thr	Arg		
			370					375						380			
aag	gct	tcc	gag	gct	gca	ctt	cag	gca	ctg	ggc	aag	acc	ctt	cct	gag	1563	
Lys	Ala	Ser	Glu	Ala	Ala	Leu	Gln	Ala	Leu	Gly	Lys	Thr	Leu	Pro	Glu		
			385					390						395			
ctg	tgg	ggc	ggg	tcc	gct	gac	ctc	gca	ggg	tcc	aac	aac	acc	gtg	atc	1611	
Leu	Trp	Gly	Gly	Ser	Ala	Asp	Leu	Ala	Gly	Ser	Asn	Asn	Thr	Val	Ile		
	400						405						410				
aag	ggc	tcc	cct	tcc	ttc	ggc	cct	gag	tcc	atc	tcc	acc	gag	acc	tgg	1659	
Lys	Gly	Ser	Pro	Ser	Phe	Gly	Pro	Glu	Ser	Ile	Ser	Thr	Glu	Thr	Trp		
	415					420					425						

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

8/12

tct gct gag cct tac ggc cgt aac ctg cac ttc ggt atc cgt gag cac	1707
Ser Ala Glu Pro Tyr Gly Arg Asn Leu His Phe Gly Ile Arg Glu His	
430 435 440 445	
gct atg gga tcc atc ctc aac ggc att tcc ctc cac ggt ggc acc cgc	1755
Ala Met Gly Ser Ile Leu Asn Gly Ile Ser Leu His Gly Gly Thr Arg	
450 455 460	
cca tac ggt gga acc ttc ctc atc ttc tcc gac tac atg cgt cct gca	1803
Pro Tyr Gly Gly Thr Phe Leu Ile Phe Ser Asp Tyr Met Arg Pro Ala	
465 470 475	
gtt cgt ctt gca gct ctc atg gag acc gac gct tac tac gtc tgg acc	1851
Val Arg Leu Ala Ala Leu Met Glu Thr Asp Ala Tyr Tyr Val Trp Thr	
480 485 490	
cac gac tcc atc ggt ctg ggc gaa gat ggc cca acc cac cag cct gtt	1899
His Asp Ser Ile Gly Leu Gly Glu Asp Gly Pro Thr His Gln Pro Val	
495 500 505	
gaa acc ttg gct gcg ctg cgc gcc atc cca ggt ctg tcc gtc ctg cgt	1947
Glu Thr Leu Ala Ala Leu Arg Ala Ile Pro Gly Leu Ser Val Leu Arg	
510 515 520 525	
cct gca gat gcg aat gag acc gcc cag gct tgg gct gca gca ctt gag	1995
Pro Ala Asp Ala Asn Glu Thr Ala Gln Ala Trp Ala Ala Ala Leu Glu	
530 535 540	
tac aag gaa ggc cct aag ggt ctt gca ctg acc cgc cag aac gtt cct	2043
Tyr Lys Glu Gly Pro Lys Gly Leu Ala Leu Thr Arg Gln Asn Val Pro	
545 550 555	
gtt ctg gaa ggc acc aag gag aag gct gct gaa ggc gtt cgc cgc ggt	2091
Val Leu Glu Gly Thr Lys Glu Lys Ala Ala Glu Gly Val Arg Arg Gly	
560 565 570	
ggc tac gtc ctg gtt gag ggt tcc aag gaa acc cca gat gtg atc ctc	2139
Gly Tyr Val Leu Val Glu Gly Ser Lys Glu Thr Pro Asp Val Ile Leu	
575 580 585	
atg ggc tcc ggc tcc gag gtt cag ctt gca gtt aac gct gcg aaa gct	2187

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



9/12

Met Gly Ser Gly Ser Glu Val Gln Leu Ala Val Asn Ala Ala Lys Ala  
 590 595 600 605

ctg gaa gct gag ggc gtt gca gct cgc gtt gtt tca gtt cct tgc atg 2235  
 Leu Glu Ala Glu Gly Val Ala Ala Arg Val Val Ser Val Pro Cys Met  
 610 615 620

gat tgg ttc cag gag cag gac gca gag tac atc gag tcc gtt ctg cct 2283  
 Asp Trp Phe Gln Glu Gln Asp Ala Glu Tyr Ile Glu Ser Val Leu Pro  
 625 630 635

gca gct gtg acc gct cgt gtg tct gtt gaa gct ggc atc gca atg cct 2331  
 Ala Ala Val Thr Ala Arg Val Ser Val Glu Ala Gly Ile Ala Met Pro  
 640 645 650

tgg tac cgc ttc ttg ggc acc cag ggc cgt gct gtc tcc ctt gag cac 2379  
 Trp Tyr Arg Phe Leu Gly Thr Gln Gly Arg Ala Val Ser Leu Glu His  
 655 660 665

ttc ggt gct tct gcg gat tac cag acc ctg ttt gag aag ttc ggc atc 2427  
 Phe Gly Ala Ser Ala Asp Tyr Gln Thr Leu Phe Glu Lys Phe Gly Ile  
 670 675 680 685

acc acc gat gca gtc gtg gca gcg gcc aag gac tcc att aac agt 2472  
 Thr Thr Asp Ala Val Val Ala Ala Ala Lys Asp Ser Ile Asn Ser  
 690 695 700

taattgccct gctgttttta gcttcaaccc ggggcagtat gattctccgg aattttattg 2532

ccccgggttg ttgttgtaa tcggtacaaa ggggtcttaag cacatccctt acttgccctgc 2592

tctccttgag cacagttcaa gaacaattct ttttaaggaaa atttagtttc atg tct 2648  
 Met Ser

1  
 cac att gat gat ctt gca cag ctc ggc act tcc act tgg ctc gac gac 2696  
 His Ile Asp Asp Leu Ala Gln Leu Gly Thr Ser Thr Trp Leu Asp Asp  
 5 10 15

ctc tcc cgc gag cgc att act tcc ggc aat ctc agc cag gtt att gag 2744  
 Leu Ser Arg Glu Arg Ile Thr Ser Gly Asn Leu Ser Gln Val Ile Glu  
 20 25 30

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

10/12

gaa aag tct gta gtc ggt gtc acc acc aac cca gct att ttc gca gca	2792
Glu Lys Ser Val Val Gly Val Thr Thr Asn Pro Ala Ile Phe Ala Ala	
35 40 45 50	
gca atg tcc aag ggc gat tcc tac gac gct cag atc gca gag ctc aag	2840
Ala Met Ser Lys Gly Asp Ser Tyr Asp Ala Gln Ile Ala Glu Leu Lys	
55 60 65	
gcc gct ggc gca tct gtt gac cag gct gtt tac gcc atg agc atc gac	2888
Ala Ala Gly Ala Ser Val Asp Gln Ala Val Tyr Ala Met Ser Ile Asp	
70 75 80	
gat gtt cgc aat gct tgt gat ctg ttc acc ggc atc ttc gag tcc tcc	2936
Asp Val Arg Asn Ala Cys Asp Leu Phe Thr Gly Ile Phe Glu Ser Ser	
85 90 95	
aac ggc tac gac ggc cgc gtg tcc atc gag gtt gac cca cgt atc tct	2984
Asn Gly Tyr Asp Gly Arg Val Ser Ile Glu Val Asp Pro Arg Ile Ser	
100 105 110	
gct gac cgc gac gca acc ctg gct cag gcc aag gag ctg tgg gca aag	3032
Ala Asp Arg Asp Ala Thr Leu Ala Gln Ala Lys Glu Leu Trp Ala Lys	
115 120 125 130	
gtt gat cgt cca aac gtc atg atc aag atc cct gca acc cca ggt tct	3080
Val Asp Arg Pro Asn Val Met Ile Lys Ile Pro Ala Thr Pro Gly Ser	
135 140 145	
ttg cca gca atc acc gac gct ttg gct gag ggc atc agc gtt aac gtc	3128
Leu Pro Ala Ile Thr Asp Ala Leu Ala Glu Gly Ile Ser Val Asn Val	
150 155 160	
acc ttg atc ttc tcc gtt gct cgc tac cgc gag gtc atc gct gcg tac	3176
Thr Leu Ile Phe Ser Val Ala Arg Tyr Arg Glu Val Ile Ala Ala Tyr	
165 170 175	
atc gag gga atc aag cag gca gct gca aac ggc cac gac gta tcc aag	3224
Ile Glu Gly Ile Lys Gln Ala Ala Ala Asn Gly His Asp Val Ser Lys	
180 185 190	
atc cac tct gtg gct tcc ttc ttc gtc tcc cgc gtc gac gtt gag atc	3272
Ile His Ser Val Ala Ser Phe Phe Val Ser Arg Val Asp Val Glu Ile	

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

11/12

195	200	205	210	
gac aag cgc ctc gag gca atc gga tcc gat gag gct ttg gct ctg cgc				3320
Asp Lys Arg Leu Glu Ala Ile Gly Ser Asp Glu Ala Leu Ala Leu Arg				
	215	220	225	
ggc aag gca ggc gtt gcc aac gct cag cgc gct tac gct gtg tac aag				3368
Gly Lys Ala Gly Val Ala Asn Ala Gln Arg Ala Tyr Ala Val Tyr Lys				
	230	235	240	
gag ctt ttc gac gcc gcc gag ctg cct gaa ggt gcc aac act cag cgc				3416
Glu Leu Phe Asp Ala Ala Glu Leu Pro Glu Gly Ala Asn Thr Gln Arg				
	245	250	255	
cca ctg tgg gca tcc acc ggc gtg aag aac cct gcg tac gct gca act				3464
Pro Leu Trp Ala Ser Thr Gly Val Lys Asn Pro Ala Tyr Ala Ala Thr				
	260	265	270	
ctt tac gtt tcc gag ctg gct ggt cca aac acc gtc aac acc atg cca				3512
Leu Tyr Val Ser Glu Leu Ala Gly Pro Asn Thr Val Asn Thr Met Pro				
	275	280	285	290
gaa ggc acc atc gac gct gtt ctg gaa ctg ggc aac ctg cac ggt gac				3560
Glu Gly Thr Ile Asp Ala Val Leu Glu Leu Gly Asn Leu His Gly Asp				
	295	300	305	
acc ctg tcc aac tcc gcg gca gaa gct gac gct gtg ttc tcc cag ctt				3608
Thr Leu Ser Asn Ser Ala Ala Glu Ala Asp Ala Val Phe Ser Gln Leu				
	310	315	320	
gag gct ctg ggc gtt gac ttg gca gat gtc ttc cag gtc ctg gag acc				3656
Glu Ala Leu Gly Val Asp Leu Ala Asp Val Phe Gln Val Leu Glu Thr				
	325	330	335	
gag ggt gtg gac aag ttt gtt gct tct tgg agc gaa ctg ctt gag tcc				3704
Glu Gly Val Asp Lys Phe Val Ala Ser Trp Ser Glu Leu Leu Glu Ser				
	340	345	350	
atg gaa gct cgc ctg aag tagaatcagc acgctgcac agtaacggcg				3752
Met Glu Ala Arg Leu Lys				
	355	360		

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

12/12

acatgaaatc gaattagttc gatcttatgt ggccgttaca catctttcat taaagaaagg 3812  
atcgtgacgc taccatcgtg agcacaacaa cgacccccctc cagctggaca aacccactgc 3872  
gcgacccgca ggataaacga ctcccccgca tcgctggccc ttccggcatg gtgatcttcg 3932  
gtgtcactgg cgacttgget cgaaggaagc tgctccccgc catttatgat ctagcaaacc 3992  
gcggattgct gccccagga ttctcgttgg taggttacgg ccgccgcgaa tggtccaaag 4052  
aagactttga aaaatacgta cgcgatgccg caagtgctgg tgctcgtacg gaattc 4108

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06471

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N 9/10, C12N 15/54, C12N 1/21, C12P 19/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N 9/10, C12N 15/54, C12N 1/21, C12P 19/18

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KOHLER, U. et al., "Transaldolase genes from the cyanobacteria Anabaena variabilis and Synechocystis sp. PCC 6803: comparison with other eubacterial and eukaryotic homologues", Plant Mol. Biol. (1996) Vol.30, No.1, pp.213-218, Acc. No. P55193	2-4, 6-16
X	COLE, S. T. et al., "Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence", Nature (1998) Vol.393, No.6685, pp.537-544, Acc. No. C70917	2-4, 6-16

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
19 October, 2000 (19.10.00)

Date of mailing of the international search report  
31 October, 2000 (31.10.00)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 00/06471

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12N 9/10, C12N 15/54, C12N 1/21, C12P 19/18

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12N 9/10, C12N 15/54, C12N 1/21, C12P 19/18

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	KOHLER, U. et al. "Transaldolase genes from the cyanobacteria Anabaena variabilis and Synechocystis sp. PCC 6803: comparison with other eubacterial and eukaryotic homologues", Plant Mol. Biol. (1996) Vol. 30, No. 1, p. 213-218, Acc. No. P55193	2-4, 6-16
X	COLE, S. T. et al. "Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence", Nature (1998) Vol. 393, No. 6685, p. 537-544, Acc. No. C70917	2-4, 6-16

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

19. 10. 00

国際調査報告の発送日

31.10.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二

4 B

9281

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**